Auswirkung der SV40-Infektion auf die Zusammensetzung der chromosomalen Nicht-Histon-Proteine in Affennierenzellen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Roswitha Gerhards

Bochum, Mai 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0029

Auswirkung der SV40-Infektion auf die Zusammensetzung der chromosomalen Nicht-Histon-Proteine in Affennierenzellen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Roswitha Gerhards

Bochum, Mai 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. H. Werchau

Korreferent: Prof. Dr. U. Winkler

Datum der mündlichen Prüfung: 7.7.1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie - Leiter: Prof. Dr. H. Werchau - der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden durch Mittel des Ministers für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen gefördert.

Herrn Prof. Dr. H. Werchau bin ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die gute Betreuung meiner Arbeit und für seine wertvollen Anregungen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. F. Mehnert danke ich für seine methodischen Ratschläge und für viele anregende Diskussionen, die meiner Arbeit nützlich waren.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. ABKÜRZUNGEN 1

B. EINLEITUNG 3

C. MATERIAL UND METHODEN 14

I. Zellen und Virus 14

1. Medien und Lösungen 14

2. Zellen 15

2.1. Zellzucht 15

2.2. Zellzahlbestimmung 16

3. Virus 16

3.1. Herstellung von Zellysaten zur SV40- und Scheininfektion 16

3.2. Virustitration 17

3.3. Virusinfektion 17

4. Serumstimulation 18

5. Behandlung der Zellen mit 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin (AraC) 18

II. Radioaktive Markierung der Zellproteine 18

1. Markierung mit ^{35}S-Methionin 18

2. Bestimmung der Gesamtradioaktivität in der Zelle 19

3. Bestimmung des Einbaus von ^{35}S-Methionin in Zellproteine 19

III. Zellaufschlüsse 20

1. Gewinnung von Gesamtzellhomogenat 20

2. Gewinnung von Chromatinproteinen 20

3. Gewinnung der Zytosolfraktion 21

IV. Methoden zur Proteinanalyse 23

1. Proteinbestimmung 23

2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 23

3. Flachbett-Fokussierung 26

4. Zweidimensionale Gelelektrophorese 28

V. Immunologische Methoden 31

1. Gewinnung von Antiseren 31

2. Voradsorption von Antiseren 33

3. Immunfluoreszenz 34

4. Neutralisationstest 35

5. Immunpräzipitation 35

VI. Chemikalien 39

D. ERGEBNISSE 41

I. Zellkinetik und Einbaustudien von ^{35}S-Methionin in SV40-infizierte CV-1 Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Infektion 41

1. Veränderungen der Zellzahl nach SV40-Infektion 41

2. Proteinbestimmung und Einbau von ^{35}S-Methionin nach Infektion 43

II. Nachweis von Nicht-Histon-Chromatinproteinen aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit analytischen Methoden 47

1. Untersuchungen von Chromatinproteinen Oh - 24h p.i. in der SDS-PAGE 47

2. Auftrennung von chromosomalen Proteinen in der Flachbett-Fokussierung 50

3. Nachweis der Zellysat- und SV40-spezifischen Unterschiede im Muster der Chromatinproteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese 55

3.1. Einfluß von 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin auf das Proteinmuster nach SV40-Infektion 56

3.2. Darstellung der chromosomalen Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion ... 61

3.3. Veränderungen im Muster der Chromatinproteine nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden 67

III. Nachweis virusspezifischer Nicht-Histon-Chromatinproteine mittels immunologischer Methoden 78

1. Charakterisierung der Immunseren durch Immunfluoreszenz und Neutralisationstest ... 78

2. Untersuchungen von viruscodierten Proteinen am Chromatin und im Zytosol von SV40-infizierten CV-1 Zellen nach Immunpräzipitation 84

2.1. Nachweis von T-Antigen und Virusstrukturproteinen mit verschiedenen Antiseren 85

2.2. Kinetik der viruscodierten Proteine 96

3. Immunpräzipitation von viruscodierten und virusinduzierten Nicht-Histon-Chromatinproteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen mit Antikörpern vom Kaninchen 99

3.1. Kinetik der chromosomalen Proteine, dargestellt durch Immunpräzipitation mit Antiserum gegen SV40-Chromatin 100

3.2. Zweidimensionale Auftrennung von Chromatinproteinen, 24h p.i., immunpräzipitiert mit Antiserum gegen SV40-Chromatin, 48h p.i. ... 104

3.3. Immunpräzipitation von chromosomalen Proteinen mit Antiserum gegen Chromatin aus SV40-transformierten AGMK-EVa Zellen 106

3.4. Darstellung der chromosomalen Proteine nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden und Immunpräzipitation mit Anti SV40-Chromatinserum 111

3.5. Nachweis von Chromatinproteinen nach Behandlung der Zellen mit Cytosinarabinosid und Immunpräzipitation mit verschiedenen Anti-Chromatinseren 114

E. DISKUSSION 118

I. Auswirkung der SV40-Infektion auf die Zellteilung und den Einbau von ^{35}S-Methionin in Zellproteine 118

II. Nachweis SV40-spezifischer Chromatinproteine durch ein- und zweidimensionale Analysenmethoden 121

III. Darstellung von viruscodierten Proteinen am Chromatin der infizierten Zellen nach Immunpräzipitation 131

IV. Verhalten von virus- und wirtszellcodierten Proteinen nach Behandlung der Zellen mit einem Hemmstoff der DNS-Replikation 135

V. Charakterisierung einiger SV40-spezifisch induzierter chromosomaler Proteine 143

F. ZUSAMMENFASSUNG 152

G. LITERATUR 156

A. ABKÜRZUNGEN

AGMK	- African Green Monkey Kidney
APS	- Ammoniumpersulfat
AraC	- 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin
BES	- N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoehtansulfonsäure
BSA	- Rinderserumalbumin
c	- 'chase'-Periode
cpe	- cytopathogener Effekt
cpm	- counts per minute
Cytosin-arabinosid	- 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin
DMEM	- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	- Dimethylsulfoxyd
DNase	- Desoxyribonuclease
DNS	- Desoxyribonucleinsäure
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- Ethylendiamintetraacetat - Na-Salz
FITC	- Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	- Hank's balanced salt solution
HEPES	- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
h p.i.	- Stunden nach Infektion
IEP	- isoelektrischer Punkt
IgG	- Immunglobulin G
K	- Kilo Dalton
K.I.E.	- Kallidinogenase-Inactivator-Einheiten
m.o.i.	- multiplicity of infection
mRNS	- Boten-Ribonukleinsäure
MW	- Molekulargewicht
NHCP	- Nicht-Histon chromosomale Proteine
NKS	- Newborn Calf Serum
OR	- Origin; Ursprung der DNS-Replikation
p	- 'pulse'-Markierung
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAGIF	- Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung
PBS	- Phosphate buffered saline
PPO	- 2,5-Diphenyloxazol

RNase	- Ribonuclease
RNS	- Ribonucleinsäure
SDS	- Na-Dodecylsulfat
SV40	- Simian Virus 40
t-Antigen	- kleines Tumor-Antigen
T-Antigen	- großes Tumor-Antigen
TCA	- Trichloressigsäure
TCID	- Tissue Culture Infective Dosis
TES	- N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminomethan-sulfonsäure
TMED	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VP	- Virusstrukturprotein
% w/w	- Gewichtsprozent
zent.	- zentrifugieren

B. EINLEITUNG

Durch die Evolution vom Einzeller zum vielzelligen Lebewesen mußten innerhalb des Organismus Regeln geschaffen werden, durch die eine sinnvolle räumliche und funktionelle Anordnung der Zellen erfolgt. Durch spezielle Differenzierungsmechanismen werden im Organismus Untereinheiten etabliert (Organe), die verschiedene Aufgaben erfüllen und die eine 'Arbeitsteilung' der Zellen innerhalb eines Individuums ermöglichen.
Da es eine Vielzahl verschiedener multizellulärer Organismen gibt und damit entsprechend viele Differenzierungsmuster existieren, müssen verschiedene Wege vorhanden sein, über die Differenzierungsanstöße gegeben werden können. Diese Mechanismen laufen auf molekularer Ebene ab und sind durch Genregulation gesteuert. Ist diese Regulation gestört, kann dies zur Transformation und damit zur ungehemmten Teilung einer Zelle führen. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen für die Störungen ist ein großes Problem, das bis heute noch nicht gelöst wurde.
Es sind viele Noxen bekannt, die zur Auslösung einer Zelltransformation führen können (chemischer, physikalischer oder viraler Art). Diese Agenzien können einerseits die Erbinformation beeinflussen und eine Veränderung der Gene bewirken (Mutation) oder andererseits ein bereits existierendes Onkogen in der Zelle aktivieren, so daß es zur Transformation der Zelle kommt.
Ebenso können epigenetische Ursachen, wie z.B. posttranskriptionelle oder posttranslationelle Störungen der Grund für die Entartung der Zelle sein.
Eine Krebszelle ist nicht allein durch ihren entarteten Phänotyp definiert, sie ist zudem in der Lage, ihre transformierenden Eigenschaften an alle Tochterzellen zu vererben. Bei Injektion einer solchen transformierten Zelle in einen geeigneten Organismus kann ein Tumor induziert werden.

Zur Erforschung der Krebsentstehung und der Transformation von Zellen bietet sich das bisher bestbekannte DNS-haltige, onkogene Simian Virus 40 (SV40) und die permissive Affennierenzelle CV-1 als experimentelles System an.

Im folgenden soll das SV40-Virus näher charakterisiert und infektionsspezifische Ereignisse in der Zelle beschrieben werden.

Die Entdeckung von SV40 war ein Zufallsprodukt bei der Herstellung von Impfstoffen gegen Polyomyelitisvirus (Sweet und Hilleman, 1960). Kurze Zeit danach wurde bekannt, daß SV40, wenn es neugeborenen Hamstern injiziert wird, in der Lage ist, Tumore zu erzeugen (Eddy et al., 1961; Eddy et al., 1962; Girardi et al., 1962). Weitere Experimente konnten zeigen, daß dieses Virus Zellen stabil transformieren kann (Shein und Enders, 1962).

SV40 gehört zu den kleinsten bekannten DNS-Viren und wird zusammen mit den Papilloma- und Polyomaviren in die Gruppe der Papovaviridae eingereiht (Melnick, 1962). In Tabelle 1 sind die wichtigsten Charakteristika dieser Virusgruppe zusammengefaßt.

Merkmal	Polyoma	SV40	Papilloma
Größe	45 nm	45 nm	55 nm
Symmetrie	Ikosaeder	Ikosaeder	Ikosaeder
Zahl der Triangulationen	7 levo	7 dextro	7 levo (Kaninchen) 7 dextro (Mensch)
Zahl der Struktureinheiten	420	420	420
Zahl der Kapsomere	72	72	72
DNS (MW)	$3{,}4 \times 10^6$	$3{,}4 \times 10^6$	5×10^6
DNS Gehalt (% W/W)	12,5	12,5	12,5
Virion (MW)	27×10^6	27×10^6	40×10^6
Strukturproteine (MW):			
großes Kapsidprotein VP1	47.000	45.000	54.000
kleine Kapsidproteine VP2	35.000	42.000	verschiedene
VP3	23.000	30.000	
Histone H3	←	15.300	→
H2A	←	14.000	→
H2B	←	13.800	→
H4	←	11.300	→

Tab.1: Charakteristika der Papovaviridae nach Griffin (1980)

SV40 besitzt ein Kapsid, das in Form eines Ikosaeders aufgebaut ist, dessen 72 Kapsomere sich aus den Virusstrukturproteinen zusammensetzen. Die DNS des Virus liegt nach Extraktion in Form eines kovalent geschlossenen doppelsträngigen Ringmoleküls in superhelikaler Form vor (Crawford und Black, 1964). Ihr Molekulargewicht beträgt $3,4 \times 10^6$. Durch den Einsatz von Restriktionsendonucleasen und die Anwendung empfindlicher Analysenmethoden, wie der Auftrennung von DNS-Bruchstücken in Agarose/Polyacrylamidgelen nach Southern (1975) und der chemischen DNS-Sequenzierungsmethode von Maxam und Gilbert (1977), konnte eine komplette Sequenzierung der SV40-DNS vorgenommen und die Anzahl von 5.224 Basenpaaren bestimmt werden (Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978).

Die Abb. 1 gibt einen Überblick über die Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonucleasen im SV40-Genom, weiterhin sind die bislang identifizierten Transkriptionsprodukte dieses Genoms ihrem entsprechenden Genomabschnitt zugeordnet (inklusive der gesplissten mRNS-Anteile).

Entsprechend ihrer biologischen Funktion gliedert sich die zirkuläre Doppelstrang-DNS in eine frühe und in eine späte Region, die jeweils eine Hälfte der Genkarte beanspruchen (Sambrook et al., 1973). Der Ursprung der DNS-Replikation liegt bei der Kartenposition 0,67 (siehe Abb. 1) und schreitet von dort gleichermaßen in beiden Richtungen auf dem DNS-Zirkel bis zur Kartenposition 0,17 fort (Danna und Nathans, 1972).

Die SV40-DNS liegt im Virion (Anderer et al., 1968; Huang et al., 1972; Lake et al., 1973), wie auch in der infizierten Zelle (White und Eason, 1971; Hall et al., 1973) als Nucleoproteinkomplex vor. Es konnte eine weitgehende Übereinstimmung in der Chromatinstruktur der SV40-DNS mit der DNS aus eukaryoten Zellen festgestellt werden (Griffith, 1975; DePamphilis et al., 1975; Müller et al., 1978). Die am SV40-Chromosom nachgewiesenen wirtszellcodierten Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Histonoktamer, das als Strukturelement von Nucleosomen dient (Chambon, 1977; Kronberg, 1977; Felsenfeld, 1978). Im Gegensatz zur eu-

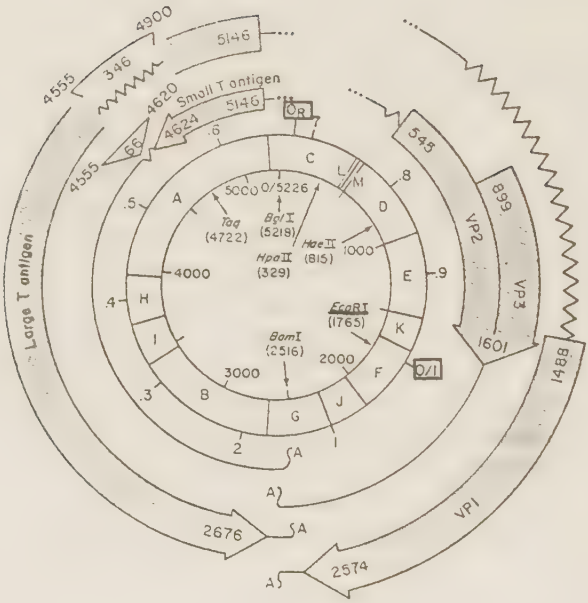


Abb. 1
Physikalische Genkarte von SV40 nach Fiers et al. (1978)

Das SV40-Genom ist als Kreis dargestellt, der ausgehend von der Schnittstelle der DNS mit der Restriktionsendonuclease EcoRI (0 bzw. 1,0) in 10 gleich große Einheiten aufgeteilt ist. Weiterhin sind die DNS-Schnittstellen der Endonuclease Hin dII/III in Form von 13 Fragmenten (A-M) auf dem DNS-Zirkel eingezeichnet. Der Ursprung der DNS-Replikation (Origin = OR) liegt im Kartenbereich 0,67 im Hin dII/III Fragment C. Von hieraus erfolgt in beiden Richtungen auf den DNS-Strängen die Transcription der frühen und späten mRNS. Die Genprodukte der verschiedenen Kartenabschnitte sind durch Pfeile dargestellt. Die aus der mRNS gesplissten Nucleotide sind durch gezackte Linien gekennzeichnet.

karyoten Zelle ist in den Nucleosomen der viralen DNS das Histon H1 nicht vorhanden. Darüberhinaus sind in der infizierten Zelle noch weitere Proteine an die SV40-DNS gebunden. Segowa und Mitarbeiter (1980) konnten an replizierenden Nucleoproteinkomplexen das Tumor-Antigen (T-Antigen) nachweisen. Eine Reihe von virus- und wirtszellcodierten Proteinen konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen am SV40-Chromosom dargestellt werden (Mann und Hunter, 1979; Milavetz et al., 1980). Neben dem Tumor-Antigen, den Virusstrukturproteinen VP1-VP3 und den Histonen, scheinen sowohl Aktin als auch Tubulin mit der SV40-DNS assoziiert zu sein.

SV40 wird nur in permissiven Affenzellen repliziert. Infektionsversuche mit Zellen anderer Tierspezies können zur Expression viraler Proteine und zur Transformation der Zellen (Mauszellen, Hamsterzellen), nicht jedoch zur Produktion infektiöser Viruspartikel führen (Smith et al., 1971; Graessmann et al., 1976). Nach Infektion der Zellen mit SV40 werden die Viruspartikel von der Zellmembran umhüllt und in Vesikeln durch das Zytoplasma an den Zellkern transportiert. Hier verschmelzen die Vesikel mit der Kernmembran. Die Dekapsidierung findet innerhalb der ersten 4 Stunden nach Infektion im Kern statt (Barbanti-Brodano et al., 1970; Hummeler et al., 1970; Gershey und Diacumakos, 1978). Das SV40-Genom wird im Zellkern transkribiert und repliziert.
Die Transkription der mRNS vom frühen Genomabschnitt beginnt im Bereich der Kartenposition 0,67 (OR) und verläuft entgegen dem Uhrzeigersinn bis zur Kartenposition 0,17 (siehe Abb. 1). Die späte Transkription beginnt unmittelbar nach der SV40-DNS-Replikation. Die Ablesung erfolgt im Uhrzeigersinn und startet bei der Kartenposition 0,72 und endet im Bereich der Kartenposition 0,17. Sowohl die frühen als auch die späten Transkriptionsprodukte werden durch Splissung zu aktiven mRNS prozessiert (Berger et al., 1977; Berk und Sharp, 1978; Horowitz et al., 1978). Vom frühen Genomabschnitt werden zwei mRNS-Spezies transkribiert. Beide haben Sedimentationskonstan-

ten von 19S. Für die späte DNS-Region existieren ebenfalls zwei mRNS-Klassen, eine 19S und eine 16S Einheit.

Als Genprodukte des frühen DNS-Genoms ließen sich bisher zwei Proteine darstellen, die als Tumorantigene bezeichnet werden: T- und t-Antigen. Die T-Antigenspezies erreichen ihre maximale Syntheserate 18-20 Stunden nach Infektion und können durch Immunfluoreszenz im Kern nachgewiesen werden.

T-Antigen wurde aus radioaktiv markierten Zellextrakten mittels der Immunpräzipitation mit Hamster Anti T-Serum dargestellt. Diesem Protein konnten Molekulargewichte zwischen 100K und 88K zugeordnet werden (Rundell et al., 1977). Durch in vitro Translation der frühen mRNS gelang es, zwei Tumorantigene nachzuweisen, deren Molekulargewichte mit 90K (T-Antigen) und 17K (t-Antigen) bestimmt wurden (Prives et al., 1977). Die Proteine zeigten teilweise Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes (Paucha et al., 1978).

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Tumorantigene in der infizierten und transformierten Zelle verschiedene Funktionen erfüllen.

So erfolgt die SV40-induzierte Stimulation der zellulären DNS-Synthese (Hatanaka und Dulbecco, 1966; Werchau et al., 1966; Tjian et al., 1978) und die Initiation der viralen DNS-Replikation erst, nachdem das T-Antigen in ausreichender Menge synthetisiert wurde (Tegtmeyer, 1972; Kriegler et al., 1978). Auch die Initiation und Regulation der Transkription der späten mRNS wird durch T-Antigenmoleküle gesteuert (Khoury und May, 1977; Graessmann et al., 1978). Bei der Initiation und Erhaltung von Transformationsprozessen spielen sowohl T-Antigen als auch t-Antigen eine bedeutende Rolle (Weinberg, 1977; Bouck et al., 1978; Butel und Soule, 1978; Sleight et al., 1978). T-Antigen induziert in der Zelle die Synthese der Desoxypyrimidinkinasen (Postel und Levin, 1976) und übt selbst als Proteinkinase Enzymaktivität aus (Griffin et al., 1979; Tjian und Robbins, 1979). Die Aufzählung der verschiedenen Funktionen des T-Antigens beweist, daß dies ein Protein ist, dem bei der Infektion und Transformation

eine Schlüsselposition zukommt, da es einerseits auf den Wirtszellmetabolismus und andererseits auf die Virusreplikation einwirkt.

mRNS, die vom späten Genomabschnitt transkribiert werden, können in darstellbaren Mengen erst nach Beginn der viralen DNS-Replikation nachgewiesen werden (Aloni et al., 1968, Oda und Dulbecco, 1968b; Sauer und Kidwai, 1968; Lindstrom und Dulbecco, 1972).
Eine 16S mRNS codiert für das Strukturprotein VP1, die 19S mRNS-Spezies für VP2 bzw. VP3 (Bratosin et al., 1978; Haegeman und Fiers, 1978). Fingerprintanalysen dieser Proteine zeigten Übereinstimmung zwischen den VP3 und VP2 Molekülen, nicht jedoch mit VP1. Daraus konnte geschlossen werden, daß VP2 und VP3 vom gleichen Genomabschnitt codiert und im gleichen Ableserahmen transkribiert werden (Rozenblatt et al., 1976; Cole et al., 1977).
VP1 besteht aus 361 Aminosäuren (Volkaert et al., 1977), die einem errechneten Molekulargewicht von ca. 40K entsprechen. Nach Bestimmungen des Molekulargewichts in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden jedoch Werte zwischen 42 und 48K bestimmt. Diese Diskrepanz kann durch eine Glykosylierung des VP1-Moleküls (Kress et al., 1977) oder durch den hohen Prolingehalt des Proteins bedingt sein (Kempe et al., 1979). Beides bewirkt eine Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit bei der Auftrennung in der SDS-PAGE, wodurch ein höheres Molekulargewicht vorgetäuscht wird (Sagrest und Jackson, 1972). VP2 besteht aus 352 Aminosäuren (38,5K) und VP3 setzt sich aus 234 Aminosäuren (27K) zusammen.

Die Expression der viralen Proteine (T- und t-Antigen und Virusstrukturproteine) in der infizierten Zelle und der T-Antigene in der transformierten Zelle, kann nur unter Beteiligung des zellulären Syntheseapparates erfolgen. Deshalb stellt sich die Frage, in welcher Form wirtszellcodierte Proteine an der Virusreplikation und Transformation beteiligt sind. Da der Zellkern sowohl für die Gen-

regulation der Wirtszelle als auch für die Virusvermehrung von größter Bedeutung ist, wird der Einfluß der Virusinfektion dort am deutlichsten in Erscheinung treten.
Eine Klasse von Proteinen, die bei der Interaktion zwischen Zellkern und Virus eine Rolle spielt, sind die chromosomalen Nicht-Histon-Proteine (NHCP). Zusammen mit der DNS, der RNS und den Histonen bilden die NHCP das Chromatin. Der Begriff chromosomale Nicht-Histon-Proteine ist rein empirischen Ursprungs und wurde eingeführt, um diese Proteine gegenüber der zweiten Gruppe von chromatinassoziierten Proteinen, den Histonen, abzugrenzen. Während die Histone am Chromatin vor allem strukturbildende Aufgaben und eine unspezifische regulative Funktion erfüllen, indem sie durch ihre Bindung an die DNS die RNS-Synthese hemmen (Allfrey et al., 1963), erfüllen die NHCP viele verschiedene Funktionen in der Zelle. Unter ihnen finden sich Enzyme, wie RNS- und DNS-Polymerasen, Proteinphosphokinasen, Histonacetylasen, -methylasen und -proteasen, DNS-Methylasen und viele andere. Daneben findet man auch hormonbindende Proteine und Strukturproteine (Simpson, 1968; McGillivray und Rickwood, 1974; Elgin und Weintraub, 1975).
Von Wang (1968) konnte gezeigt werden, daß die NHCP in der Zelle an der Genregulation beteiligt sind. Er konnte nachweisen, daß durch chromosomale Nicht-Histon-Proteine die RNS-Synthese stimuliert wird. Weitere Befunde, die die Rolle der NHCP als regulatorische Proteine bestätigen, wurden von Marushige und Dixon (1969) geliefert, die in stoffwechselaktiven Geweben größere Mengen von NHCP als in ruhenden Zellen erfassen konnten. Auch die Regulation spezifischer Gene, die z.B. für Globin- und Histonmoleküle codieren, werden durch chromosomale Proteine gesteuert (Barrett et al., 1974; Chiu et al., 1975; Gilmour et al., 1975; Stein et al., 1975).
Die NHCP werden während des gesamten Zellzyklus, inklusive der Mitose synthetisiert (Stein und Baserga, 1970). Ihre Synthese nimmt nach Stimulation durch Hormone und

Pharmaka, bei gleichbleibender Gesamtproteinsynthese zu. Diese Stimulierung ist nicht von der DNS- und Histonsynthese abhängig (Patel und Wang, 1964; Teng und Hamilton, 1969; Ruddon und Rainey, 1970; Stein und Baserga, 1970). In vitro Versuche konnten zeigen, daß NHCP die organspezifische Transkription anregen (Paul und Gilmour, 1968; Wang, 1970; Barrett et al., 1974).
Neben den regulatorischen Funktionen der Nicht-Histon-Chromatinproteine wird auch ihre Mitwirkung bei der Strukturbildung diskutiert. Laskey et al. (1978) konnten aus Xenopus Oozyten ein NHCP reinigen, das nach Bindung an die Histone zur Bildung von Nucleosomen an der DNS führte.
Die NHCP bilden eine heterogene Proteinklasse. Ihr Molekulargewicht umfaßt den Bereich von 5K bis 200K, die isoelektrischen Punkte der einzelnen Spezies liegen zwischen pH 4 und pH 10, wobei der Hauptanteil der Proteine in den Bereich von pH 5 bis pH 7 einzuordnen ist. Die Anzahl der nachgewiesenen NHCP ist je nach Analysenmethode sehr hoch. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten mehr als 500 verschiedene Proteine dargestellt werden (Peterson und McConkey, 1976).

Durch die Analyse der NHCP aus Tumorzellen, bei der die stimulierte Synthese einzelner NHCP-Klassen nachgewiesen wurde, konnten transformationsspezifische Veränderungen am Chromatin erfaßt werden (Busch et al., 1976). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß auch bei einer Infektion der Zellen mit SV40 Veränderungen in der Zusammensetzung der chromsomalen Nicht-Histon-Proteine nachzuwcisen sind.
Ziel dieser Arbeit ist es, virusspezifische Veränderungen am Chromatin der infizierten Zelle zu erfassen. Dabei sollen sowohl die viruscodierten, als auch wirtszellcodierte Proteine, die nach Infektion neu am Chromatin erscheinen (Induktion), oder die in der Zelle bereits vorhanden sind, deren Synthese jedoch verstärkt erfolgt (Stimulation) nachgewiesen werden. Dazu wird zunächst

durch Nachweis der Zellteilungsaktivität und des Einbaus von radioaktivem Methionin in chromosomale Proteine der Zeitpunkt nach Infektion bestimmt, der größtmögliche Veränderungen in der Zusammensetzung der NHCP erwarten läßt. Durch Analyse des Chromatinmusters zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird ein Überblick über das eindimensionale Proteinmuster der NHCP gegeben. Eine detaillierte Untersuchung über das Ausmaß der Veränderungen wird durch die Anwendung verschiedener zweidimensionaler Analysenmethoden erreicht. Dabei werden gleichzeitig durch Verwendung eines Hemmstoffs der DNS-Synthese (Arabinofuranosylcytosin) die Virusstrukturproteine, deren Synthese nur nach der viralen DNS-Replikation erfolgen kann, identifiziert. Durch 'pulse-chase'-Markierung, bei der die Chromatingewinnung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Markierung durchgeführt wird, sollen die NHCP in ihrer Verweilzeit am Chromatin näher charakterisiert werden. Durch Untersuchungen mit verschiedenen immunologischen Methoden und vor allem durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antiseren sollte es möglich sein, sowohl die viruscodierten als auch bestimmte virusspezifisch-induzierte oder -stimulierte zelluläre Proteine in angereicherter Form nachzuweisen. Zu diesen Experimenten werden Antiseren von tumortragenden Hamstern (Anti T-Serum), Serum gegen SV40-Virionen und Serum gegen SV40-infizierte Affennierenzellen eingesetzt, um viruscodierte Proteine am Chromatin und im Zytosol der infizierten Zelle darzustellen. Antiseren gegen gereinigtes Chromatin aus SV40-infizierten Zellen und aus SV40-transformierten AGMK-EVa-Zellen werden eingesetzt, um SV40-induzierte und -stimulierte Proteine, deren genetischer Ursprung das Wirtszellgenom ist, durch Immunpräzipitation zu erfassen. Weiterhin wird das Verhalten dieser Proteine nach Arabinofuranosylcytosin-Behandlung und 'pulse-chase'-Markierung näher charakterisiert. Die Analyse der Immunpräzipitate wird in der SDS-PAGE oder in der zweidimensionalen Gelelektrophorese durchgeführt.

Das Fernziel dieser Forschungsarbeit besteht darin, transformationsspezifische Ereignisse, die eine Zelle in eine neoplastische Zelle umformen und deren Entstehen nur durch Beteiligung zellulärer regulatorischer Proteine von statten geht, zu erkennen, um daraus in Zukunft präventive Maßnahmen gegen eine Krebsentstehung bzw. Pharmaka, die das Wachstum eines bereits transformierten Zellklons gezielt hemmen, entwickeln zu können.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Zellen und Virus

1. Medien und Lösungen

Medium zur Zellzucht:
Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) mit 15 mM BES, 15 mM HEPES, 15 mM TES, 15 mM $NaHCO_3$, pH 7,4 und 5.000 I.E. Penicillin/l, 50 mg Streptomycin/l. Weiterhin enthielt das Medium 10% Serum von neugeborenen Kälbern (NKS).

Medium zur Stimulation der Zellproliferation:
DMEM (s.o.) mit 20% NKS angereichert.

Medium zur Hemmung der DNS-Synthese:
DMEM (s.o.) mit 20 µg/ml 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin supplementiert.

Medium zur radioaktiven Markierung der Zellen:
DMEM (s.o.) ohne Methionin wurde das radioaktiv markierte ^{35}S-Methionin in der gewünschten Endkonzentration (µCi/ml) zugesetzt.

Hank's balanced salt solution (HBSS):
1,26 mM $CaCl_2$, 8,9 mM D-Glucose, 0,36 mM KCl, 0,83 mM $MgSO_4$, 136,9 mM NaCl, 0,33 mM NaH_2PO_4, 0,28 mM Phenolrot.

Trypsin-EDTA-Lösung:
138 mM NaCl, 3 mM KCl, 7 mM Na_2HPO_4, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM D-Glucose, 5 mM Tris-HCl, pH 7,7, 0,4 mM EDTA, 0,0015% Phenolrot , $2x10^4$ I.E. Penicillin/l, 20 mg Streptomycin/l, 0,5 mg Trypsin/l.

2. Zellen

a) Als Zellsystem für die analytischen Untersuchungen diente die permanente, epitheloide Zellinie CV-1, die aus Nieren der Grünen Meerkatze (Cercopethicus aethiops) gewonnen wurde (Flow Laboratories, Bonn). Die Zellen befanden sich zur Zeit der Experimente in der 40. bis 50. Passage.

b) Die SV40-transformierte-Hamsterzellinie H65/90B wurde von V.Defendi (New York University, Medical Center) etabliert und uns dankenswerterweise von W.Deppert (Biochemisches Institut der Universität Ulm) zur Verfügung gestellt.

c) Die SV40-transformierten AGMK-EVa Zellinie wurde durch Infektion primärer Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (AGMK) mit niedriger Viruskonzentration gewonnen (Koprowski et al., 1967). Diese Zellen gelangten durch G.Sauer (Krebsforschungszentrum Heidelberg), der sie uns freundlicherweise überließ, in unsere Arbeitsgruppe.

2.1. Zellzucht

Die Zellen wurden in subkonfluentem Zustand (ca. $3x10^6$ Zellen/Petrischale=57 cm^2) mit Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen und mit 2 ml der gleichen Lösung nach 8-10 minütiger Inkubation von der Petrischale abgelöst. Nach 1:3 Verdünnung der Zellen in frischem Medium (s.o.) konnten sie wiederum auf Kulturgefäße (Nunc, Wiesbaden) ausgesät werden. Die Vermehrung der Zellen erfolgte maximal über 10 Passagen.
Für die ersten 24 Stunden nach Aussaat inkubierte man diese Zellen in einer Atmosphäre aus 5% CO_2 und 95% Luft, bei 37°C. Für die weitere Wachstumsperiode wurden die Zellen bei 37°C, ohne Zusatz von CO_2 inkubiert.

Eine maximale Zelldichte von $5x10^6$ Zellen/Petrischale erreichten die Zellkulturen ca. 6-7 Tage nach Aussaat. Mit dieser Dichte wurden sie bei den Experimenten eingesetzt.

2.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellen einer Petrischale wurden nach dreimaligem Waschen mit HBSS durch 2 ml Trypsin abgelöst und nach gutem Resuspendieren für 5 min bei 500xg in der Minifuge (Heraeus-Christ, Osterode/Harz) zentrifugiert. Die Zellzahl konnte nach einer zweiten Zentrifugation (s.o.) und Aufnahme des Zellsediments in 1 ml HBSS in der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

3. Virus

Plaquegereinigtes Simian Virus 40 (SV40), Stamm 777 (Büttner und Werchau, 1973) wurde als Stammvirus eingesetzt.

3.1. Herstellung von Zellysaten zur SV40- und Scheininfektion

Zur Virusgewinnung wurden konfluente CV-1 Zellkulturen mit HBSS gewaschen und mit SV40 in Medium infiziert. Die Multiplizität der Infektion (m.o.i.) betrug $1x10^{-3}$/ Zelle.
Die Zellen wurden 12 Tage lang bei 37°C mit der Virussuspension inkubiert. Die Freisetzung der Viruspartikel erfolgte durch zweimaliges Einfrieren bei -20°C und Auftauen bei Raumtemperatur. Das SV40-Zellysat wurde 30 min bei 12.000xg in der Kühlzentrifuge (Typ J-21B mit dem Rotor JA20, Beckman, München) zentrifugiert. Der Überstand mit den Viruspartikeln (SV40-Suspension)

lagerte bis zum Gebrauch bei -20°C.
Die Gewinnung von Zellysat zur Scheininfektion erfolgte parallel zur SV40-Infektion, indem man die Zellen mit Medium inkubierte. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden in gleicher Weise wie bei den virusinfizierten Zellen durchgeführt.

3.2. Virustitration

Subkonfluente CV-1 Zellkulturen wurden in Zellkulturröhrchen mit planer Fläche (NUNC, Wiesbaden) mit je 1 ml Virussuspension, in dekadischen Verdünnungsreihen, der Titrationsstufen 10^{-3}-10^{-12}, in jeweils 4 Parallelansätzen infiziert und bei 37°C inkubiert. 24 Stunden nach Infektion konnte die Virussuspension abgenommen und durch frisches Medium ersetzt werden. Die Ausbildung eines cytopathogenen Effekts (cpe) konnte durch mikroskopische Begutachtung bis zum 14. Tag nach Infektion verfolgt werden. Die Bestimmung der Viruskonzentration ($TCID_{50}$) erfolgte nach Reed und Muench (1938). Der Titer der verwendeten Virussuspensionen lag zwischen 10^8 und 10^9 Viruspartikeln/ml.

3.3. Virusinfektion

Die CV-1 Zellen einer Petrischale ($5x10^6$ Zellen/57 cm^2) wurden mit 2 ml einer verdünnten Virussuspension (50-100 $TCID_{50}$/Zelle) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Parallel zur Virusinfektion erhielten die Kontrollzellen zur Scheininfektion das gleiche Volumen an Zellysat. Nach der Virusadsorption wurden die SV40- und scheininfizierten Zellen mit frischem Medium versetzt.

4. Serumstimulation

Zur Gewinnung von Chromatinproben aus serumstimulierten Zellen wurden CV-1 Zellen für 2 Stunden mit DMEM, das mit 20% NKS supplementiert war, inkubiert. Bis zur Aufarbeitung erhielten die Zellen frisches Medium mit 10% NKS.

5. Behandlung der Zellen mit 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin (AraC)

Zur Hemmung der zellulären und viralen DNS-Synthese wurden die Zellkulturen mit Beginn der Schein- und der SV40-Infektion mit 10 ml DMEM + 200 µg AraC (Cytosinarabinosid) pro Petrischale ($5x10^6$ Zellen) inkubiert. Auch während der radioaktiven Markierung der Zellen wurde die Droge, bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung in gleicher Konzentration den Zellen verabreicht. Zellkulturen auf Deckgläsern, für die Immunfluoreszenz wurden in gleicher Weise behandelt.

II. Radioaktive Markierung der Zellproteine

1. Markierung mit ^{35}S-Methionin

Zu den angegebenen Zeiten nach Infektion wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Kulturen einmal mit HBSS gewaschen. Zur Markierung erhielten die Zellen entweder für 10-15 Minuten ('pulse') oder für 2 Stunden ein methioninfreies Medium, das je nach Experiment mit 100-300 uCi ^{35}S-Methionin (spezifische Radioaktivität 550-1.200 Ci/mmol, New England Nuclear, Dreieich) angereichert war.
Bei 'pulse-chase'-Markierung wurden die Zellen nach

'pulse'-Markierung für die entsprechenden 'chase'-Perioden mit Medium, dem 300 mg/l nicht markiertes Methionin zugesetzt war, inkubiert.

2. Bestimmung der Gesamtradioaktivität in der Zelle

Um die Aufnahme von ^{35}S-Methionin in der Zelle zu bestimmen, wurden 100 µl markiertes Gesamtzellhomogenat (s.u.) mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit (Aquasol) vermischt und die Radioaktivität im Scintillationsspektrometer bestimmt (TriCarb, Packard, Frankfurt/Main).

3. Bestimmung des Einbaus von ^{35}S-Methionin in Zellproteine

100 µl radioaktiv markierter Proteinprobe (Gesamtzellhomogenat, Chromatin- oder Zytosolfraktion) wurden mit gleichem Volumen 25%-iger, eiskalter TCA versetzt. Die Proteine wurden während einer zweistündigen Inkubation bei 4°C präzipitiert. Durch Zentrifugation für zweimal 2 min bei 6000xg in einer Tischzentrifuge (Typ 5412, Eppendorf, Hamburg) konnten die gefällten Polypeptide sedimentiert werden.
Das Sediment wurde dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die Probe konnte in 1 ml 0,1 N NaOH - 1% SDS aufgenommen und gelöst werden. 100 µl dieser Probe wurde mit 10 ml Aquasol vermischt und die in Protein eingebaute Radioaktivität durch Scintillationszählung (s.o.) bestimmt.

III. Zellaufschlüsse

1. Gewinnung von Gesamtzellhomogenat

Die konfluent gewachsenen Zellen einer Petrischale wurden dreimal mit HBSS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA von der Kulturplatte abgelöst. Nachdem die Zellen in 5 ml HBSS resuspendiert waren, wurden sie für 10 min bei 500xg in der Laborzentrifuge sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen des Sediments in HBSS konnte es in 1 ml HBSS resuspendiert werden und zur Desintegration der Zellen zweimal für 10 s auf Stufe 5 mit Ultraschall behandelt werden (Sonifier B 12, Branson Instr. Inc., Connecticut, USA). Zur Hemmung von Proteasen wurden dem Puffer 10 K.I.E./ml Aprotinin zugesetzt. Alle Aufarbeitungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2. Gewinnung von Chromatinproteinen

a) Lösungen zur Chromatinisolierung

Lösung A: 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris pH 7,4, 3 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl
Lösung B: Lösung A + 1% Triton X-100 + 0,5% Natriumdesoxycholat
Lösung C: 1 mM Tris pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 12,5% Glycerin
Alle Lösungen enthielten 10 K.I.E./ml Aprotinin

b) Isolierung des Chromatins

Die konfluenten Zellen wurden dreimal mit 5 ml HBSS und einmal mit 5 ml Lösung A pro Petrischale gewaschen. Danach lysierte man die Zellen durch 10 mi-

nütige Inkubation mit 1 ml Lösung B bei Raumtemperatur. Dieser Vorgang und die weiteren Reinigungsschritte wurden unter dem Phasenkontrast-Mikroskop begutachtet (Diavert, Leitz, Wetzlar). Nachdem sich die Zellstrukturen aufgelöst hatten und die Zellkerne deutlich sichtbar hervortraten, wurden die Kerne von der Petrischale abgenommen und, um möglichst alle Kerne zu gewinnen, das Kulturgefäß mit 1 ml Lösung A nachgewaschen. Die Zellkerne wurden gut resuspendiert und bei 600xg für 10 s in der Minifuge sedimentiert. Zytoplasmatische Bestandteile sowie die gelösten Membranen blieben bei diesem Zentrifugationsschritt im Überstand, aus dem bei späterer Weiterbehandlung die Zytosolfraktion gewonnen wurde (s.u.). Nach Resuspension des Kernsediments in 10-fachem Volumen Lösung A und 10 minütiger Zentrifugation bei 600xg konnten auch die letzten zytoplasmatischen Bestandteile abgetrennt werden. Das Kernsediment wurde in 20-fachem Volumen Lösung C resuspendiert und 15 min bei 3.000xg zentrifugiert. Das letzte Sediment bildete die Chromatinfraktion, die je nach Weiterverwendung mit verschiedenen Lösungen inkubiert wurde (s.u.).
Alle Isolierungsschritte, mit Ausnahme der Zellyse, wurden bei 4°C durchgeführt.
In Abb. 2 sind die einzelnen Aufarbeitungsschritte, die zur Isolierung des Chromatins und zur Gewinnung der Zytosolfraktion durchgeführt wurden, nochmals zusammengefaßt.

3. Gewinnung der Zytosolfraktion

Mit dem nach Lyse der Zellen durch Triton X-100 und Natriumdesoxycholat erhaltenen Zytoplasmaüberstand wurde zur Gewinnung der löslichen Zytosolproteine eine Zentrifugation für 90 min bei 105.000xg durchgeführt (Ultrazentrifuge L5-75, Rotor SW41, Beckman,

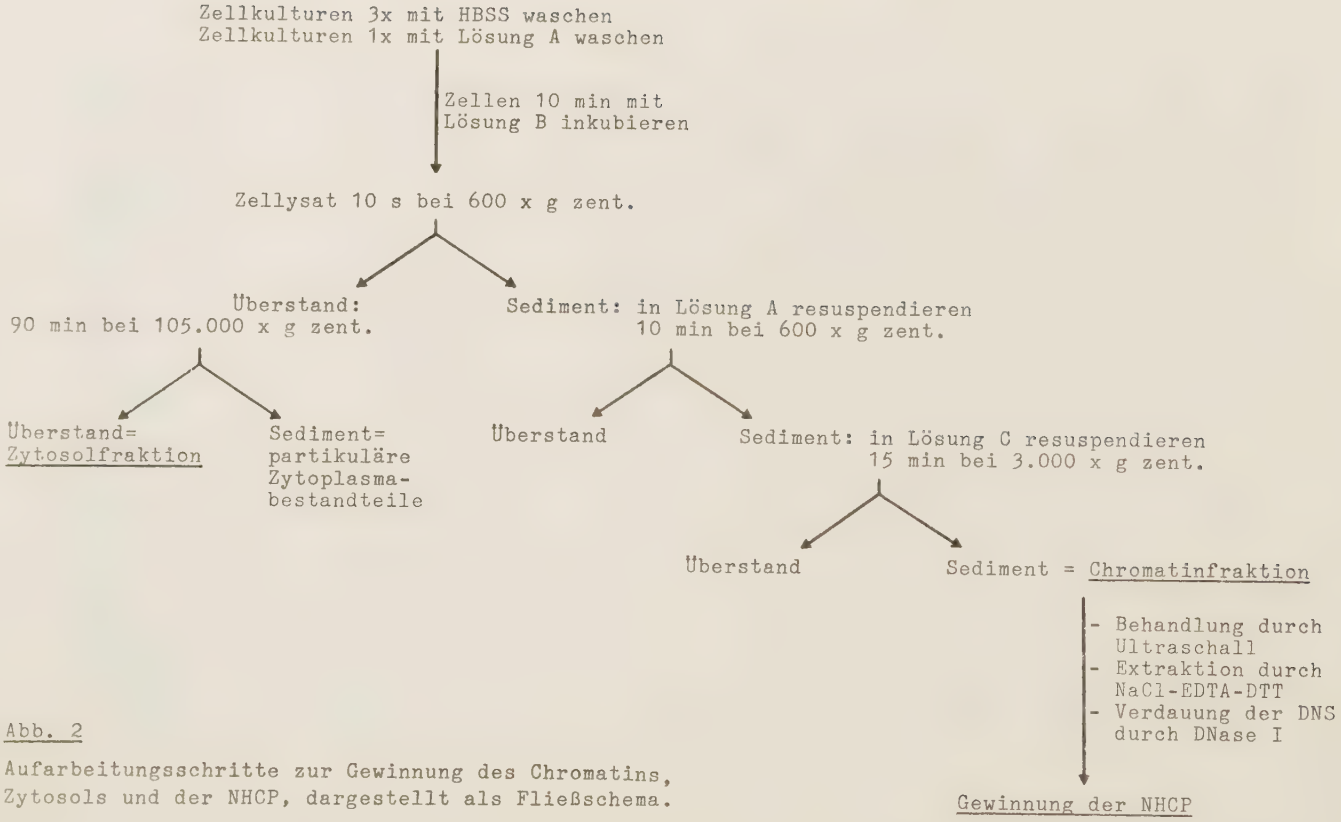


Abb. 2

Aufarbeitungsschritte zur Gewinnung des Chromatins, Zytosols und der NHCP, dargestellt als Fließschema.

München). Die Zytosolfraktion wurde vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

IV. Methoden zur Proteinanalyse

1. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) wurden 100 µl Proteinprobe, wie unter Punkt II.3 beschrieben, mit TCA präzipitiert. Das getrocknete Proteinsediment konnte in 0,1 N NaOH - 1% SDS durch 3 minütiges Erhitzen auf 100°C gelöst werden. Die Proteinkonzentration wurde mit Rinderserumalbumin als Vergleichsstandard mit dem Autoanalyzer bestimmt (Technicon, Bad Vilbel).

2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

a) Lösungen und Gelzusammensetzung

Ultraschallpuffer: 10 mM Tris, pH 8,0
Extraktionspuffer: 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH 8,0
Probenpuffer:
62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS, 5% ß-Mercaptoäthanol, 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau
Elektrodenpuffer: 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8,6
Sammelgel:
5% Acrylamid, 0,14% Bisacrylamid, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,03% APS, 0,1% TMED
Trenngel:
1o% Acrylamid, 0,27% Bisacrylamid, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,05% TMED

Farblösung:
40% Methanol, 10% Eisessig, 0,1% Coomassie brilliant blue
Entfärber: 5% Methanol, 7,5% Eisessig

b) Vorbereitung der Proben zur SDS-PAGE

Die Chromatinproteine wurden direkt nach Isolierung entweder in 100 µl 10 mM Tris pH 8,0 pro $5x10^6$ Zellen aufgenommen und zweimal für 10 s auf Stufe 5 mit Ultraschall behandelt, oder durch 100 µl (pro $5x10^6$ Zellen) eines Extraktionspuffers durch Inkubation für mindestens 3 Stunden bei 4°C unter häufigem Resuspendieren von der DNS extrahiert. Nach TCA-Präzipitation der Proben wurden gleiche Proteinmengen in Probenpuffer aufgenommen, 10 s bei Stufe 5 beschallt und 5 min bei 100°C erhitzt.

c) Durchführung der SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Maizel (1971) und Laemmli (1970) hergestellt. Die Flachgele hatten das Format 90 x 150 x 1 mm. Für die vertikale Elektrophorese entwickelte Studier (1970) eine Apparatur, die hier in modifizierter Form zur Auftrennung verwendet wurde. Die Proteinproben konnten mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel in 10%-igen Acrylamidgelen in einer Zeit von 3,5 - 4 Stunden aufgetrennt werden.

d) Färbung und Fluorographie der Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel in der Färbelösung für 5 min bei 60°C fixiert und gefärbt. Anschließend konnte das Gel bei gleicher

Temperatur in ca. 1 - 2 Stunden in Methanol-Eisessig entfärbt und für 30 Minuten gewässert werden. Gele mit radioaktiven Proben wurden 1 Stunde in DMSO entwässert und für 3 Stunden in einer Lösung aus 20% PPO in DMSO (w/w) inkubiert. Zur Präzipitation des PPOs und Rehydratisierung wurde das Gel für 30 min in H_2O eingelegt und anschließend unter Vakuum auf Whatman-Chromatographie-Papier MM3 getrocknet. Zur Fluorographie wurde das Gel auf einen Röntgenfilm gepreßt (XR-5, Eastman Kodak Company, Rochester, USA) und für die Dauer der Exposition (4 Wochen) bei -70°C gelagert. Die Entwicklung des Röntgenfilms (Kodak Entwickler LX24) dauerte 5 min, die Fixierung (Kodak Fixierer AL4) wurde 3 min lang durchgeführt.

e) Molekulargewichtsbestimmung

Parallel zu den Proteinproben wurde ein Gemisch aus Eichproteinen bekannter Molekulargewichte (nach Weber und Osborne, 1969), die im folgenden aufgeführt sind, aufgetrennt.

ß-Galactosidase (E. coli)	-	130K
Phosphorylase a (Kaninchenmuskel)	-	97K
Conalbumin	-	86K
Rinderserumalbumin	-	68K
Katalase (Rinderleber)	-	60K
Glutamat-Dehydrogenase (Rinderleber)	-	53K
Ovalbumin (Hühnerei)	-	45K
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	-	29K
Chymotrypsinogen (Rind)	-	25K
Myoglobin (Wal)	-	17K
Cytochrom c (Pferdeherz)	-	12K

Anhand dieser Molekulargewichte wurden die relativen Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine bestimmt.

3. Flachbett-Fokussierung

Die Ausarbeitung der Methode erfolgte nach Radola (1969)

a) Lösungen und Gelansatz

Probenpuffer:
10 M Harnstoff, 3,5% ß-Mercaptoäthanol, 1% Triton X-100

Ampholytlösungen: pH-Bereich 4-6 und pH-Bereich 3-10

Anodenlösung: 0,1 N H_2SO_4

Kathodenlösung: 1 M Äthylendiamin

Elutionspuffer:
0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0, 0,05% Triton X-100, 0,005% Natriumdesoxycholat

Gelansatz:
5 g Sephadex G 75 superfine in 80 ml H_2O anrühren + 1% Ampholytlösung pH 4-6 + 4% Ampholytlösung pH 3-10 + 0,1% Triton X-100 + 0,5 mM DTT + 14 ml H_2O

Alle Gelbestandteile wurden miteinander vermischt und auf einer Glasplatte mit den Maßen 240 x 100 x 5 mm gleichmäßig verteilt. Zuvor wurden am rechten und linken Rand der eingefaßten Glasplatte Filterpapierstreifen (100 x 5 mm), die mit einer 1:20 verdünnten Ampholytlösung (pH-Bereich 3-10) befeuchtet waren, eingelegt. Anschließend wurde die Konsistenz des Gels durch Verminderung des Wassergehalts um 32% durch Eindampfen unter einem Ventilator verfestigt. Auf die Anoden- bzw. Kathodenstreifen wurden nochmals Filterpapierstreifen, die zuvor mit 0,1 N H_2SO_4 bzw. 1 M Äthylendiamin getränkt waren, aufgelegt

b) Vorbereitung der Proben zur Flachbett-Fokussierung

Chromatinproben von ca. $1x10^8$ Zellen wurden in 1 ml Probenpuffer (s.o.) aufgenommen und zweimal 10 s auf

Stufe 5 mit Ultraschall behandelt. Durch gutes Resuspendieren und Inkubation über 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Proteine gelöst.

c) Durchführung der Flachbett-Fokussierung

In das vorbereitete Sephadex-Gel wurde mit Hilfe eines Probenapplikators, ca. 4 cm vom Kathodenende entfernt, ein Gelstreifen ausgehoben, der, mit der Probe vermischt, in den Spalt wieder eingefügt werden konnte. Der Lauf wurde bei 10°C in einer Fokussierkammer (Multiphor 2117, LKB, Bromma, Schweden) über 12 Stunden bei 5 W konstanter Leistung durchgeführt.

d) Messung des pH-Gradienten

Nach erfolgter Auftrennung der Proteinprobe wurde das Gel durch Auflegen eines Rasters in 30 gleichgroße Fraktionen eingeteilt. Mit einer geeichten pH-Elektrode (405M5NS, Ingold, Frankfurt/Main) konnte der pH-Wert jeder einzelnen Fraktion gemessen und daraus der pH-Gradient über alle Fraktionen bestimmt werden.

e) Elution der Proteine aus den Fraktionen

Es wurden 30 Spritzen (5 ml Volumen) vorbereitet, in die ein angefeuchtetes Filterpapierplättchen eingelegt und deren unteres Ende mit Parafilm verschlossen wurde. In jede Spritze füllte man das Gel aus jeweils einer Fraktion ein und schlemmte es mit 1 ml Elutionspuffer auf. Nachdem das Gel sich abgesetzt hatte, wurden 2 ml Elutionspuffer überschichtet und der untere Spritzenverschluß gelöst. Die eluierten Proteine konnten in einem Reagenzglas aufgefangen werden. Zur 2. Elution wurden nochmals 2 ml Puffer auf jedes Gelbett geschichtet und die Proteinsuspensionen beider Elutionen vereinigt.

f) Analyse des Proteinmusters

Pro Gelfraktion konnten ca. 4 ml Proteinsuspension gewonnen werden, die zur Proteinpräzipitation mit gleichem Volumen eiskalter 25%-iger TCA versetzt wurde. Die getrockneten Proteinsedimente konnten durch Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst werden. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in der SDS-PAGE (siehe IV.2.).

4. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese (1. Dimension:Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung, PAGIF; 2. Dimension: SDS-PAGE) wurde von O'Farrell (1975) beschrieben und hier in modifizierter Form durchgeführt.

a) Lösungen und Gelansatz für die 1. Dimension

RNase-Puffer:
50 µg/ml Pankreas RNase A in 0,01 M Tris pH 7,4,
1 mM $MgCl_2$

DNase-Stammlösung:
1 mg/ml Pankreas DNase I in 0,01 M Tris pH 7,4,
1 mM $MgCl_2$

PAGIF-Probenpuffer:
9,5 M Harnstoff, 2% Triton X-100, 2% Ampholytlösung, 5% ß-Mercaptoäthanol

Ampholytlösung: pH-Bereich 3-10

Gelüberschichtungslösung: 8 M Harnstoff

Probenüberschichtungslösung:
9 M Harnstoff + 1% Ampholytlösung

Anodenlösung: 0,01 N H_3PO_4

Kathodenlösung: 0,02 N NaOH

Agarose zum Eingießen der Rundgele:
1% Agarose C in SDS-PAGE-Probenpuffer

Gelbestandteile:
9 M Harnstoff, 3,8% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 2% Triton X-100, 5% Ampholytlösung, 0,01% APS, 0,07% TMED
Die Gelbestandteile wurden gemischt und im Rundgel (Länge: 13 mm, Durchmesser: 2 mm) gegossen. Zur Überschichtung während der Polymerisation wurden 20 µl Gelüberschichtungspuffer verwendet.

b) Vorbereitung der Proben

Zur Auftrennung der Chromatinproteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die Proben nach zwei unterschiedlichen Methoden gewonnen:

1. Extraktion der Proteine von der DNS.
   Wie unter Punkt IV.2. beschrieben konnten die chromosomalen Proteine durch Behandlung des Chromatins mit Extraktionspuffer gewonnen werden. Nach erfolgter TCA-Präzipitation der Proteine (siehe II.3.) wurde das getrocknete Proteinsediment mit PAGIF-Probenpuffer bei Raumtemperatur für mindestens 12 Stunden inkubiert und zwischenzeitlich zweimal mit Ultraschall behandelt (10 s, Stufe 5).
2. Gewinnung der chromosomalen Proteine durch Verdauung der DNS.
   Das Chromatin von 5×10^6 Zellen wurde in 100 µl RNase-Puffer zweimal für 10 s, Stufe 5, beschallt. Danach wurde die DNase-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 50 µg DNase I pro ml Probe zugesetzt und das Reaktionsgemisch 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend konnten die Proben durch Lyophilisation (Unitrap II, Cenco, Haan) einge-

engt werden. Zur Auftrennung wurden die Proben in PAGIF-Probenpuffer gelöst (s.o.).

c) Auftrennung in der PAGIF (1. Dimension)

Die Rundgele wurden in die Fokussierkammer eingesetzt, die Anoden- bzw. Kathodenreservoirs mit Lösungen (0,01 N H_3PO_4 bzw. 0,02 N NaOH) gefüllt und ein Vorlauf der Gele (15 min 200 V, 30 min 300 V, 30 min 400 V) durchgeführt. Nachdem 20-50 µl Proteinprobe auf das Fokussiergel geladen waren und 50 µl Probenüberschichtungspuffer aufgetragen waren, fokussierte man die Proteine 12 Stunden bei 400 V und 1 Stunde bei 800 V.

d) Messung des pH-Gradienten

Nach Beendigung der Auftrennung wurde ein Vergleichsgel, das zur pH-Wertbestimmung parallel zu den mit Protein beladenen Rundgelen mit PAGIF-Probenpuffer überschichtet war, in 0,5 cm lange Stücke zerteilt und jedes Fragment in 1 ml bidestilliertem H_2O equilibriert. Der pH-Wert jeder Fraktion wurde nach 1 Stunde durch Messung mit einer pH-Elektrode bestimmt. Anhand dieser pH-Werte konnte der Verlauf des pH-Gradienten erfaßt werden.

e) Vorbereitung der Fokussiergele für die SDS-PAGE

Die Rundgele der 1.Dimension mit den fokussierten Proteinen wurden für 3 Stunden im SDS-PAGE-Probenpuffer bei 37°C equilibriert. Anschließend wurden sie auf ein vorbereitetes SDS-PAGE-Gel mit 2 mm Dicke übertragen und in Agaroselösung eingebettet.

f) Auftrennung in der SDS-PAGE (2. Dimension)

Die SDS-PAGE wurde mit gleichen Puffern und Lösungen, wie sie unter IV.2 beschrieben sind, durchgeführt. Die Auftrennung der fokussierten Proteine erfolgte bei 40 mA/Gel in 10%-igen Acrylamidgel. Nach Beendigung des Laufs wurden Färbung und Fluorographie der Gele wie beschrieben durchgeführt (siehe IV.2).

V. Immunologische Methoden

1. Gewinnung von Antiseren

Zur Untersuchung mit immunologischen Methoden wurden im Hamster, im Affen, in der Ziege und in Kaninchen Antikörper gegen verschiedene Antigene hergestellt. Von jeder Tierspezies wurde vor Immunisierung ein Kontrollserum (Praeimmunserum) gewonnen.

a) Hamster Anti SV40-Tumor-Serum (Hamster Anti T-Serum)

3 Wochen alte Hamster bekamen $1x10^6$ SV40-transformierte H65/90B Zellen subkutan injiziert. Nach Ausbildung eines Tumors, ca. 6 Wochen nach Inokulation, wurden die Hamster entblutet und die Seren in der Immunfluoreszenz auf SV40-infizierten CV-1 Zellen, 20h p.i., ausgetestet. Diejenigen Seren, die eine starke Kernfluoreszenz verursachten, wurden vereinigt und bei weiteren immunologischen Experimenten als Hamster Anti T-Serum eingesetzt.

b) Affen Anti SV40-Serum*

Affen der Gattung Cercopithecus aethiops wurden heminephrektomiert und aus der Niere eine primäre Zellkultur angelegt. Nach Infektion dieser Zellen mit SV40 verabreichte man dem Affen die autologen Zellen. Durch diese Prozedur sollte erreicht werden, daß nur gegen SV40-spezifisch induzierte oder-veränderte Proteine Antikörper gebildet werden.

c) Ziegenserum gegen SV40-Virionen*

Partiell gereinigte SV40-Virionen (Reinigung und Anreicherung durch KBr- und CsCl-Gradientenzentrifugation) wurden einer Ziege verabreicht. Nach mehrmaligen Boosterinjektionen konnte das Serum gewonnen und mit einem Teil des Serums eine IgG-Fraktionierung durchgeführt werden. Sowohl das Vollserum, wie auch die gereinigte Antikörperfraktion des Serums wurden bei den Versuchen eingesetzt.

d) Kaninchen Anti-Chromatinseren

Kaninchen wurden mit Chromatinproteinen aus scheininfizierten und NKS-stimulierten CV-1 Zellen (24h p. i.), SV40-transformierten (AGMK-EVa-Zellen) und SV40-infizierten CV-1 Zellen (6, 12, 18, 24 und 48h p.i.) immunisiert. Dabei bekamen die Tiere 500-800 µg Protein in Freud's inkomplettem Adjuvants (9 Teile Bayol + 1 Teil Arlacel) verabreicht. In Abständen von 4 Wochen wurden die Tiere dreimal mit jeweils der halben Proteinkonzentration, wie sie bei der Primärimmu-

* Die Immunisierung und Gewinnung des Serums und die IgG-Fraktionierung des Ziegenserums wurden von F.Mehnert durchgeführt

nisierung verwendet wurde, geboostert. Jeweils 14 Tage nach einer Boosterung wurde Blut entnommen und in der Immunfluoreszenz die Induktion von Antikörpern nachgewiesen.

2. Voradsorption von Antiseren

a) Affen Anti SV40-Serum

Dieses Serum wurde auf CV-1 Zellen voradsorbiert um kreuzreagierende Antikörper und solche die gegen zelluläre Proteine gerichtet sind zu entfernen. Dazu wurden Zellkulturen auf Petrischalen dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 2 ml des Immunserums für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Serum wurden zuvor 20 K.I.E. Aprotinin zugesetzt. Anschließend konnten die Zellen mit einem Gummischaber von der Petrischale abgelöst und mit einer Pasteurpipette im Serum resuspendiert werden. Diese Suspension wurde 10 min bei 3000xg in der Minifuge zentrifugiert. Den Überstand übertrug man auf eine zweite Zellkultur und führte die Adsorption in gleicher Weise wie zuvor beschrieben durch. Dieser Vorgang wurde noch dreimal wiederholt, so daß das Serum insgesamt auf 5 Zellkulturen voradsorbiert war. Der Überstand nach der 5. Zentrifugation bildete das voradsorbierte Serum.

b) Ziegenserum gegen SV40-Virionen

Bei diesem Serum sollten zusätzlich zu den Antikörpern gegen zelluläre Proteine auch diejenigen gegen T-Antigen entfernt werden. Aus diesem Grund wurde die Adsorption, wie oben beschrieben, sowohl auf CV-1 Zellen als auch auf AGMK-EVa-Zellen durchge-

führt. Dieses Serum wurde zum Nachweis von Virusstrukturproteinen in der Immunfluoreszenz eingesetzt.

3. Immunfluoreszenz

a) Puffer und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Antiseren

Phosphate buffered saline (PBS):
140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$, 8,4 mM Na_2HPO_4, 1,1 mM KH_2PO_4, pH 7,4

Anti-Hamsterserum von der Ziege, FITC-konjugierte IgG-Fraktion

Anti-Affen IgG vom Kaninchen, FITC-konjugierte IgG-Fraktion*

Anti-Ziegenserum vom Kaninchen, FITC-konjugierte IgG-Fraktion

Anti-Kaninchenserum von der Ziege, FITC-konjugierte IgG-Fraktion

Die käuflich erworbenen FITC-konjugierten IgG-Fraktionen wurden von Dynatech, Plochingen, bezogen.

b) Durchführung der Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz nach Gilden (1965) wurden Zellkulturen von SV40-infizierten CV-1 bzw. AGMK-EVa-Zellen, gewachsen auf Deckgläsern, zweimal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Aceton, zweimal für 10 min, fixiert. Die Zellen wurden nochmals mit PBS

---

* Die Reinigung der Affen-IgG-Fraktion, die Immunisierung von Kaninchen mit diesem Antigen und die Herstellung der FITC-konjugierten IgG-Fraktion vom Kaninchen wurden von F. Wehmert durchgeführt.

gewaschen, bevor sie für 30 min bei 37°C mit Immunserum inkubiert wurden. Vor dem Auftragen der FITC-konjugierten Antikörper mußten nichtadsorbierte Serumbestandteile durch gründliches Waschen der Zellkulturen mit PBS entfernt werden. Die zweite Inkubation mit FITC-markiertem IgG wurde 45 min bei 37°C durchgeführt. Danach wurde nicht gebundenes IgG durch Waschen mit PBS abgetrennt. Die Immunfluoreszenz wurde im Auflichtmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung (Dialux 20, Leitz, Wetzlar) begutachtet. Charakteristische Fluoreszenzen wurden fotographiert (Film: Ektachrom 400, Kodak; Fotoaufsatz: Orthomat, Leitz).

4. Neutralisationstest

Durch den Neutralisationstest konnten Antikörper im Serum nachgewiesen werden, die eine Infektion der Zellen durch SV40 verhindern.
Immunseren in verschiedenen Verdünnungen (duadische Verdünnungsreihen in DMEM) wurden in 4 Parallelansätzen mit SV40 ($5x10^6$ Viruspartikel/ml) für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von CV-1 Zellen ($3x10^5$ Zellen/ml) als Testsystem konnte 5-7 Tage nach Inokulation die Entwicklung eines cpe beobachtet werden. Der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung, bei der in 50% der Zellkulturen die Infektion durch SV40 gehemmt war, wurde als Titer für die neutralisierenden Antikörper angegeben.

5. Immunpräzipitation

Mit der 'Protein A Antikörper Adsorbens Technik' nach Kessler (1975) konnten über das Zellwandprotein A von Staphylococcus aureus die Fc-Stücke der Antikörper, die zuvor mit Antigenmolekülen inkubiert

wurden, gebunden werden. Diese Methode bietet den Vorteil, daß Antigen-Antikörper-Komplexe ohne Zugabe eines zweiten Serums (Anti IgG-Serum) isoliert werden können.

a) Puffer, Lösungen und Staphylokokkensuspension

NET-Puffer:
150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0

Waschpuffer für Staphylokokken:
NET pH 8,0 + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 0,25% Gelatine

Waschpuffer für Immunpräzipitate:
NET pH 8,0 + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 1mM DTT, 0,2% BSA
NET pH 8,0 + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 0,2% BSA
NET pH 8,0 + 0,05% Triton X-100, 0,01% Natriumdesoxycholat
ET: 1mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0
Allen Puffern wurde 10 K.I.E. Aprotinin/ml zugesetzt

Lösungen zur Elution der Antigen-Antikörper-Komplexe:
SDS-PAGE-Probenpuffer (zur Auftrennung in der SDS-PAGE)
1% SDS + 0,02 M DTT (zur Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese)

Staphylokokkensuspension:
10 %-ige, formalinfixierte Suspension von Staphylococcus aureus Cowan I, in NET pH 8,0 + 0,05 % Triton X-100, 0,01 % Natriumdesoxycholat

b) Vorbereitung der Staphylokokkensuspension

Die 10%-ige Bakteriensuspension wurde nach dem Auftauen bei 6.000xg in einer Tischzentrifuge (Eppen-

dorf, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen der Staphylokokken in NET + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 0,25% Gelatine wurden die Bakterien in NET pH 8,0 + 0,05% Triton X-100, 0,01% Natriumdesoxycholat aufgenommen und resuspendiert.

c) Voradsorption der Proteinproben

Wie bereits beschrieben (siehe IV.2.b) konnten die Chromatinproteine durch 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM Tris pH 8,0 von der DNS abgelöst werden. Als Zytosolproben wurde der 105.000xg Überstand der Zytoplasmafraktion (siehe III.2.c) verwendet. Die zur Voradsorption eingesetzten Proben hatten einen Proteingehalt von ca. 0,5 mg/ml.

100 µl Proteinprobe wurde mit 50 µl Präimmunserum derjenigen Tierspezies von der das Immunserum zur Immunpräzipitation eingesetzt werden sollte, für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Staphylokokkensuspension und Inkubation für 2 Stunden bei 4°C konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation bei 6.000xg sedimentiert werden. Der Überstand wurde abgenommen und als voradsorbierte Proteinprobe zur Immunpräzipitation verwendet.

d) Durchführung der Immunpräzipitation

200 µl voradsorbierte Proteinprobe (Chromatin- oder Zytosolfraktion) wurden mit 50 µl Kontroll- oder Immunserum für 30 min bei 4°C inkubiert, bevor 100 µl gewaschene Staphylokokkensuspension zugesetzt wurde. Nach Inkubation für 2 Stunden bei 4°C konnten die Immunkomplexe durch Zentrifugation bei

6.000xg (zweimal für 2 min) sedimentiert werden. Um unspezifisch adsorbierte Proteine abzutrennen wurde die Suspension nacheinander mit folgenden Lösungen gewaschen:

1) NET + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 1 mM DTT, 0,2% BSA
2) NET + 0,5% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 0,2% BSA
3) NET + 0,05% Triton X-100, 0,01% Natriumdesoxycholat
4) ET

e) Elution der Antigen-Antikörper-Komplexe von den Staphylokokken

Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Staphylokokkensedimente entweder in 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (zur Analyse der Proteine in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese) oder in 50 µl einer Lösung aus 1% SDS - 0,02 M DTT (zur Auftrennung der Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese) aufgenommen und resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei 60°C konnten die eluierten Proteine durch zweimaliges zentrifugieren bei 6.000xg für 2 min im Überstand gewonnen werden.
Zur Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proben 5 min bei 100°C erhitzt. Für die Analyse des Proteinmusters in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mußte die Lösung mit den immunpräzipitierten Proteinen auf eine Endkonzentration von 9,5 M Harnstoff, 2% Triton X-100, 2% Ampholytlösung, 5% β-Mercaptoäthanol gebracht werden.

VI. Chemikalien

Acrylamid	-	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose c	-	Pharmacia, Freiburg
Ammoniumpersulfat (APS)	-	Serva, Heidelberg
Ampholytlösungen:		
a) Ampholine	-	LKB Instruments, Bromma/ Schweden
b) Pharmalyte	-	Pharmacia, Freiburg
Aprotinin	-	Novo Industrie, Mainz
Aquasol	-	New England Nuclear, Dreieich
1-ß-D-Arabinofuranosyl-cytosin (AraC)	-	Sigma, Taufkirchen
Arlacel A	-	Serva, Heidelberg
Bayol	-	Serva, Heidelberg
N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)	-	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	-	Serva, Heidelberg
Carboanhydrase	-	Serva, Heidelberg
Chymotrypsinogen a	-	Serva, Heidelberg
Coomassie brillant blue R 250	-	Serva, Heidelberg
Cytochrom c	-	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	Riedel de Haen, Köln
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	-	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	-	Sigma, Taufkirchen
DNase I	-	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM)	-	Gibco Bio-Cult, Karlsruhe
ß-Galactosidase	-	Boehringer, Mannheim
Glutamatdehydrogenase	-	Boehringer, Mannheim
Glycin	-	Sigma, Taufkirchen
Harnstoff, ultrapure	-	Becton Dickinson, Abt. Schwarz/ Mann, Heidelberg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	-	Sigma, Taufkirchen

Katalase	-	Serva, Heidelberg
β-Mercaptoäthanol	-	Serva, Heidelberg
Methionin	-	Sigma, Taufkirchen
N-Methylen Bisacrylamid	-	Serva, Heidelberg
Myoglobin	-	Serva, Heidelberg
Na-Desoxycholat	-	Sigma, Taufkirchen
Na-Dodecylsulfat (SDS)	-	Serva, Heidelberg
Newborn calf serum (NKS)	-	Gibco Bio-Cult, Karlsruhe
Ovalbumin	-	Serva, Heidelberg
Penicillin, Na-Salz	-	Serva, Heidelberg
Phenolrot	-	Serva, Heidelberg
Phosphorylase a	-	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin	-	Serva, Heidelberg
RNase A	-	Sigma, Taufkirchen
Saccharose	-	Merck, Darmstadt
Sephadex G 75 superfine	-	Pharmacia, Freiburg
Streptomycin	-	Serva, Heidelberg
N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)	-	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TMED)	-	Serva, Heidelberg
Triton X-100	-	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	-	Difco, Frankfurt/Main

Alle weiteren Chemikalien stammten entweder von Baker (Groß-Gerau), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Köln) oder von Serva (Heidelberg). Alle verwendeten Reagenzien waren analysenrein.

D. ERGEBNISSE

I. Zellkinetik und Einbaustudien von ^{35}S-Methionin in SV40-infizierte CV-1 Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Infektion

Bevor die Analyse der Proteinzusammensetzung von schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen in Angriff genommen wurde, sollte zunächst untersucht werden, ob sich SV40-spezifische Veränderungen auch an Hand der Zellteilungsaktivität, des Proteingehalts oder des Einbaus an radioaktiven Aminosäuren nachweisen lassen.
Dazu war es notwendig, die Zellzahl zu verschiedenen Zeiten nach Infektion in SV40- und schein-infizierten Zellen zu bestimmen.
Parallel dazu wurden die Zellen mit ^{35}S-Methionin markiert und der Einbau der Aminosäure in Proteine des Gesamtzellhomogenats, des Chromatins und des Zytosols untersucht.
Durch die Einbaustudien sollte der günstigste Zeitpunkt nach Infektion bestimmt werden, zu dem am Chromatin ein optimaler Einbau von ^{35}S-Methionin in die NHCP zu erwarten ist.

1. Veränderungen der Zellzahl nach SV40-Infektion

Konfluente CV-1 Zellen wurden mit Zell- bzw. SV40-Lysat für 2h inkubiert. Nach 0h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h und 24h p.i. wurden die Zellen von den Petrischalen durch Trypsin abgelöst und die Zellzahl von 3 Petrischalen in jeweils 3 Parallelversuchen bestimmt. Die Zellzahl in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Infektion ist in Abb. 3 dargestellt.
Anscheinend gibt es bei der Infektion der Zellen bereits toxische Effekte, die sich je nach Vorbehandlung der

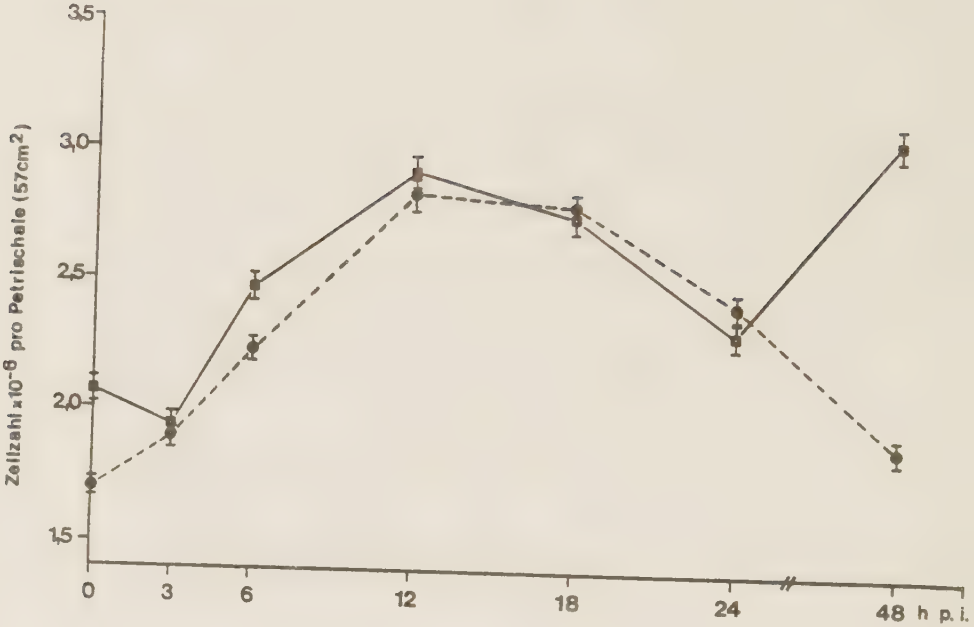


Abb. 3

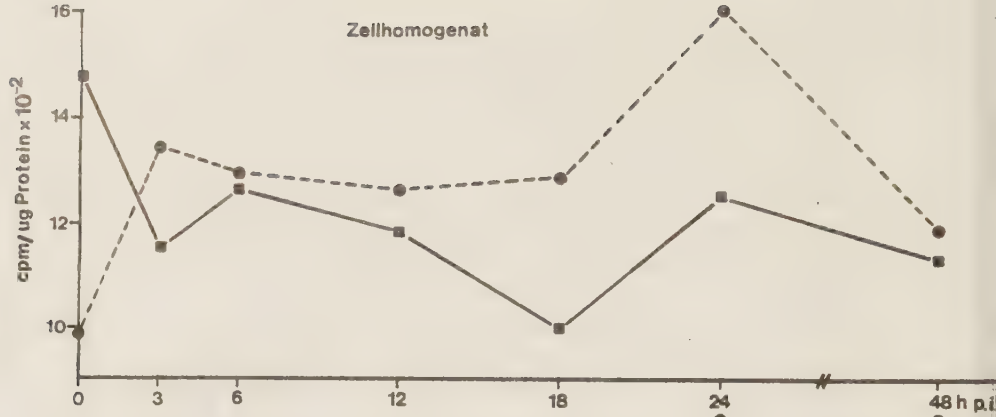
Zellzahlbestimmung aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen 0h bis 48h p.i.
Die Zellen wurden mit gleicher Dichte auf Petrischalen ausgesät und nach 7 Tagen mit Zell- bzw. SV40-Lysat infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Zellzahlbestimmung wie unter Material und Methoden beschrieben.

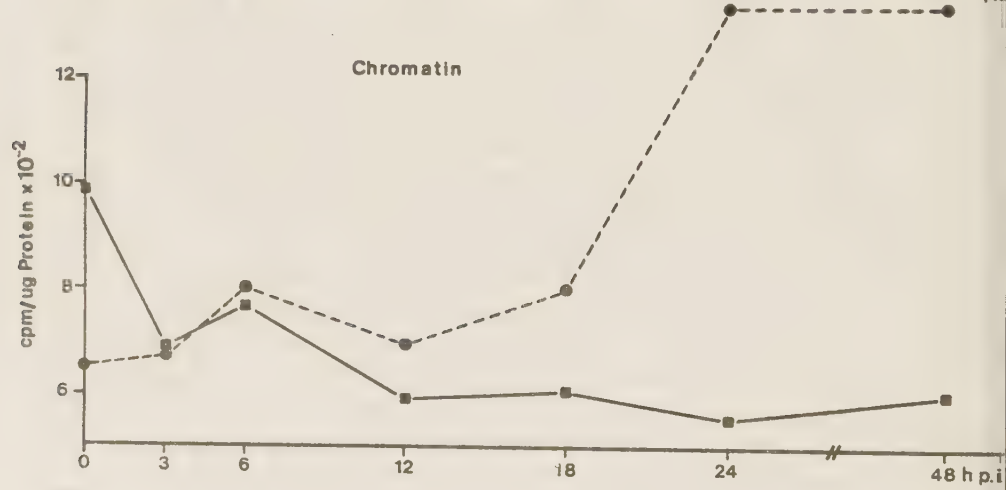
———— : scheininfizierte Zellen
--------- : SV40-infizierte Zellen

Zellen mit zeitlicher Verzögerung bemerkbar machen. Während bei den schein-infizierten Zellen erst 3h nach Infektion eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen ist, scheint bei den SV40-infizierten Zellen eine Zellyse bereits während der Virusadsorption stattzufinden. Sowohl die Zellen für die Schein-Infektion, als auch die Zellen, die anschließend mit SV40 infiziert wurden, hatten bei ihrer Aussaat gleiche Zelldichte.
Wie aus Abb. 3 hervorgeht, teilen sich die Zellen nicht synchron, da eine Verdopplung der Zellzahl zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden kann. Immerhin ist zwischen der 3. und 12. Stunde nach Infektion ein Anstieg der Zellzahl um 50 % bei den Kontrollzellen und um 48,6 % bei den SV40-infizierten CV-1 Zellen festzustellen. Daraus ist zu schließen, daß sich die Zellen bei Versuchsbeginn in parasynchronem Zustand befanden. Bis zur 24. Stunde nach Infektion ist ein leichter Rückgang der Zellzahl zu beobachten. Von der 24. bis 48. Stunde nach Infektion findet in den schein-infizierten Zellen erneut eine Welle von Zellteilungen statt, deren Maximum bei dieser Untersuchung nicht mehr erfaßt wurde. Bei den SV40-infizierten Zellen nimmt die Zellzahl von der 18. bis zur 48. Stunde kontinuierlich ab. Dies ist durch die hohe $TCID_{50}$ (50-100) bei der Infektion der Zellen zu erklären, wodurch zu diesen Zeitpunkten nach Infektion bereits bei einigen Zellen die SV40-spezifische Zellyse bewirkt wird.

2. Proteinbestimmung und Einbau von ^{35}S-Methionin nach Infektion

Zur detaillierten Untersuchung des Einbaus von radioaktiven Aminosäuren in die Zellproteine wurden von den schein- und SV40-infizierten Zellen ein Gesamtzellhomogenat, eine Chromatinfraktion und eine Zytosolprobe gewonnen.


Zellhomogenat
cpm/ug Protein x 10⁻²
16
14
12
10
0
3
6
12
18
24
48 h p.i


Chromatin
cpm/ug Protein x 10⁻²
12
10
8
6
0
3
6
12
18
24
48 h p.i

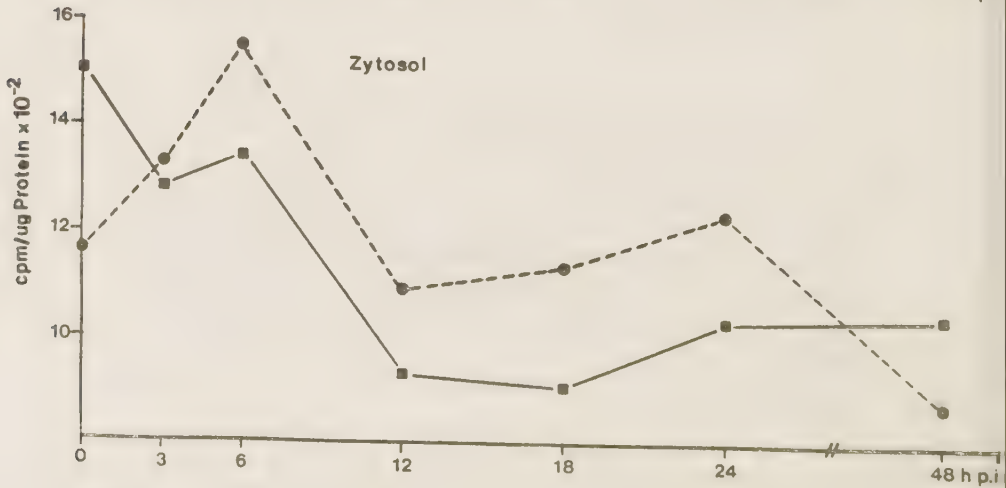

Zytosol
cpm/ug Protein x 10⁻²
16
14
12
10
0
3
6
12
18
24
48 h p.i

Abb.4

Das Gesamtzellhomogenat wurde hergestellt, indem trypsinierte, mit Puffer gewaschene Zellen durch Ultraschall aufgebrochen wurden. Die Chromatin- und Zytosolgewinnung erfolgte nach der Methode, wie sie auch zu anderen analytischen Untersuchungen verwendet wurde (siehe Material und Methoden). Jeweils gleiche Mengen Homogenat, Chromatin (ultrabeschallt) und Zytosol wurden mit TCA gefällt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Jeweils aus der gleichen Probe wurde die eingebaute präzipitierbare Radioaktivität bestimmt. Parallel dazu wurde aus nicht TCA gefällten Proben des Zellhomogenats die gesamte Radioaktivität bestimmt.
In säurepräzipitierbare Proteine wurde durchschnittlich 58,9 % ± 6,27 der gesamten, von der Zelle aufgenommenen Radioaktivität eingebaut. Die restlichen 41,1 % liegen als lösliche Radioaktivität in der Zelle vor. Dieser Prozentsatz des Einbaus gilt nur für die schein- und SV40-infizierten Zellen Oh bis 24h p.i. Die SV40-infizierten Zellen 48h p.i. zeigen einen höheren Anteil an eingebautem ^{35}S-Methionin. Hier liegt der Prozentsatz bei 79,3 %. Dies kann mit der erhöhten Biosynthese der viralen Proteine in Zusammenhang stehen.
Untersucht man für die einzelnen Zellfraktionen die auf den Proteingehalt bezogene Menge von eingebauter Radioaktivität (cpm/µg Protein) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Infektion, erhält man folgende Ergebnisse (vergl. Abb. 4): Oh p.i. erfolgt in den schein-infizierten Zellen, in allen drei untersuchten Zellfraktionen, ein stimulierter Einbau an Radioaktivität. Ein Effekt, der 3h p.i. jedoch wieder reduziert wird. In den SV40-infizierten

---

Legende zu Abb. 4
Spezifischer Einbau von ^{35}S-Methionin in Protein aus Zellhomogenat, Chromatin und Zytosol von schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen
2h vor Aufarbeitung wurden die Zellen mit 60 µCi ^{35}S-Methionin/Petrischale inkubiert. Daran anschließend wurden die Zellen aufgearbeitet und die Protein- und cpm-Bestimmung wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt.
———— = cpm/µg Protein aus schein-infizierten Zellen
- - - - - - - - = cpm/µg Protein aus SV40-infizierten Zellen

Zellen ist die Synthese radioaktiv markierter Proteine Oh p.i. deutlich niedriger als in den schein-infizierten Zellen. Hier macht sich die hemmende Wirkung der Virusinfektion, wie sie bereits bei der Zellzahlbestimmung in Erscheinung tritt, bemerkbar.
Ab der 3. Stunde nach Infektion wird in Zellproteine aus SV40-infizierten Zellen mehr Radioaktivität eingebaut als in Kontrollzellen. 24h p.i. ist die maximale Synthese von radioaktiv markierten Proteinen des Zellhomogenats erreicht und fällt bis zur 48. h p.i. wieder ab.

Am Chromatin wird die Synthese ^{35}S-Methionin haltiger Proteine aus SV40-infizierten Zellen bereits 18h p.i. stimuliert und setzt sich bis zur 24. h p.i. fort. Wie der Verlauf zwischen der 24. und 48. h p.i. ist, läßt sich aus diesen Untersuchungen nicht entnehmen. 48 h p.i. ist jedoch der hohe Einbau an Radioaktivität noch vorhanden. Der Einbau an radioaktivem Methionin am Chromatin aus schein-infizierten Zellen befindet sich von der 12. Stunde bis zur 48. Stunde nach Scheininfektion auf niedrigem Niveau.
Bei den Proteinen der Zytosolfraktion findet in den SV40-infizierten Zellen, 6h p.i., eine Stimulierung im Einbau der Radioaktivität statt. Eine leichte Erhöhung des Einbaus ist zu diesem Zeitpunkt auch bei den chromosomalen Proteinen zu verzeichnen. Zur 12. Stunde nach Infektion sinkt die Einbaurate sowohl in der schein- als auch in der SV40-infizierten Zelle bereits wieder ab. Während der Einbau von ^{35}S-Methionin in die Zytosolproteine von der 24. bis 48. Stunde nach Infektion im Zytosol der schein-infizierten Zellen gleichbleibend verläuft, fällt die Einbaurate in SV40-Zytosolproteine stark ab. Da zur gleichen Zeit der Einbau von Radioaktivität in Chromatinproteine der SV40-infizierten Zelle stark stimuliert erfolgt, wird angenommen, daß in diesem Zeitraum bevorzugt die Proteine des Chromatins synthetisiert werden.

II. Nachweis von Nicht-Histon-Chromatinproteinen aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit analytischen Methoden

Zur Untersuchung der chromosomalen Nicht-Histon-Proteine (NHCP) wurden CV-1 Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit ^{35}S-Methionin markiert und nach der Methode von Liew und Chan (1976) mit Detergentien aufgearbeitet. Dabei wird einerseits die DNS mit den assoziierten Proteinen (Chromatin) und andererseits die löslichen, zytoplasmatischen Bestandteile in Form der Zytosolfraktion gewonnen.
Die Chromatingewinnung durch Lyse der Zellen mit Triton X-100 und Natriumdesoxycholat wurde gewählt, weil sie die geringste Verunreinigung der Chromatinproben durch andere Zellproteine gewährleistet (Gerhards, 1977). Abgetrennt und nicht in die Untersuchung mit einbezogen wurden die bei 105.000 x g sedimentierten Zellbestandteile.
Veränderungen im Proteinmuster der CV-1 Zelle nach SV40-Infektion können durch die Auftrennung der Proteine in der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) festgestellt werden. Durch die Analyse der chromosomalen Proteine in der Flachbett-Fokussierung und der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird die Bestimmung der isoelektrischen Punkte (IEP) und der Molekulargewichte dieser Proteine ermöglicht.
Untersuchungen mit den genannten Methoden wurden an schein- und SV40-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion und unter verschiedenen Markierungsbedingungen durchgeführt.

1. Untersuchungen von Chromatinproteinen Oh -24h p.i. in der SDS-PAGE

Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden mit

^{35}S-Methionin für 10 Minuten markiert ('pulse') und anschließend für 30 Minuten mit einem Medium, das mit nicht markiertem Methionin angereichert war, inkubiert ('chase').
Der Überschuß an Methionin im Medium bewirkt die Verdrängung von nicht eingebautem ^{35}S-Methionin aus der Zelle. Dadurch werden bei der Analyse der NHCP nur diejenigen Proteine erfaßt, die während des 'pulse' im Zytoplasma synthetisiert werden und im Laufe der 'chase'-Periode an das Chromatin binden.
Die Chromatinaufarbeitung wurde zu den Zeitpunkten Oh, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h p.i. durchgeführt. Die Chromatinproteine wurden durch Ultraschall-Behandlung in PAGE-Probenpuffer in Lösung gebracht (s. Material und Methoden).
Die Abb. 5a und 5b zeigen das Proteinmuster von Chromatinproben aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, Oh bis 24h p.i., aufgetrennt in der SDS-PAGE. Die in der Abb. 5a dargestellten Proteinproben unterscheiden sich hinsichtlich ihres eindimensionalen Bandenmusters zu den frühen Zeitpunkten nach Infektion (Oh - 9h p.i.) kaum. Lediglich das SV40-Chromatin* Oh p.i. weist eine Besonderheit auf: trotz Auftrennung gleicher Proteinmengen des Kontroll*- und SV40-Chromatins wurde in der SV40-infizierten Zelle der Einbau an ^{35}S-Methionin Oh p.i. reduziert (vergl. auch Abb. 4, Chromatin). Nur die 46K Bande ist mit der gleichen Intensität vorhanden wie auch am Kontroll-Chromatin.
15h p.i. (Abb.5b) treten am SV40-Chromatin erstmals Veränderungen im Bandenmuster gegenüber dem Kontroll-Chromatin auf: bei 86K und 48K erscheinen Banden verstärkt.

---

*Die Bezeichnung Kontroll- und SV40-Chromatin wird gleichbedeutend für die Begriffe Chromatin aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen verwendet

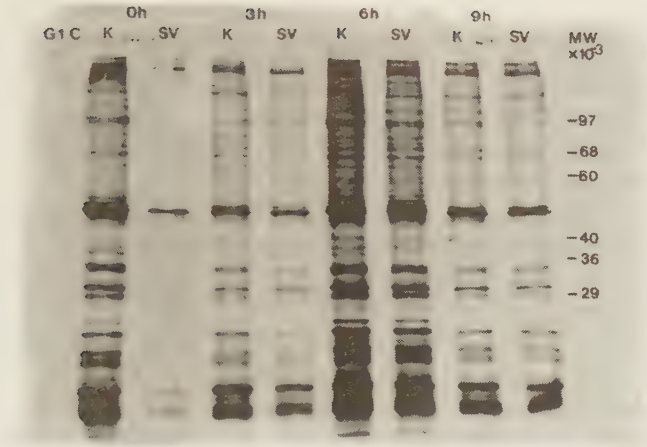


Abb. 5a

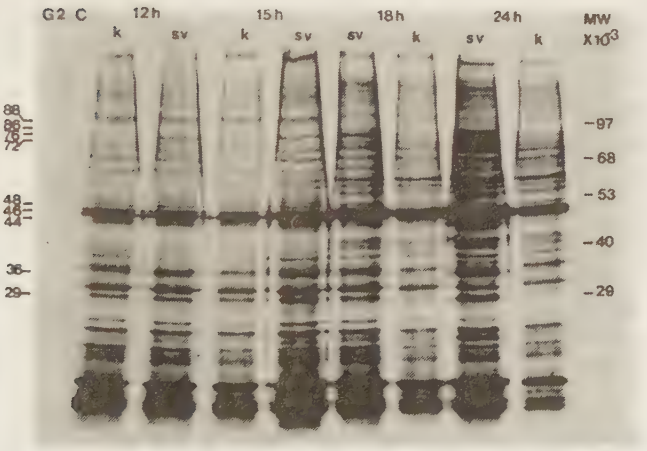


Abb. 5b

Abb. 5a/b

Fluorogramme von SDS-Polyacrylamidgelen mit Chromatinproben aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen Oh bis 24h p.i.
Die Zellen wurden vor Chromatinisolierung mit 300 uCi ^{35}S-Methionin pro 5x10^6 Zellen für 10 Minuten markiert ('pulse'). Es folgte ein 30-minütiger 'chase' mit einem Überschuß an Methionin im Medium. Die Chromatinproben wurden durch Ultraschall in SDS-PAGE-Probenpuffer homogenisiert. Pro Geltasche wurden ca. 50 ug Protein eingesetzt, die Gele wurden für 10 Tage mit Röntgenfilmen exponiert. Die Zahlen am rechten Gelrand kennzeichnen die Positionen der Vergleichsproteine zur relativen Molekulargewichtsbestimmung.

K = Kontroll-Chromatin
SV = SV40-Chromatin
Oh, 3h usw. = Zeipunkt der Chromatinaufarbeitung p.i.

18h und 24h p.i. tritt diese Stimulierung noch stärker hervor und wird von der Neusynthese eines 88K und eines 44K Proteins begleitet. Im Bereich 76-72K wird 24h p.i. eine diffuse Doppelbande sichtbar, der in der Kontrollprobe zwei scharfe Banden gegenüberstehen. Proteine im Molekulargewichtsbereich um 48-44K sind am SV40-Chromatin stark stimuliert, bei 36K und 29K treten neue Proteinbanden auf. Auch im Histonbereich (21-11K) können Proteine ab der 15. Stunde nach Infektion am SV40-Chromatin vermehrt nachgewiesen werden.

2. Auftrennung von chromosomalen Proteinen in der Flachbett-Fokussierung

Zur weiteren Analyse der chromosomalen Proteine aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen wurde die isoelektrische Fokussierung im granulierten Sephadex-Gel (Flachbett-Fokussierung) durchgeführt. Die Proteine werden bei dieser Methode entsprechend ihrer Ladung bis zu einem pH-Wert, der ihrem IEP entspricht, fokussiert.
Durch die Wahl von geeigneten Ampholytlösungen (z.B. pH 3-10) kann eine gute Proteintrennung erreicht werden (Radola, 1969). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Kombination der Flachbett-Fokussierung und der SDS-PAGE gewählt, um chromosomale Proteine nachzuweisen. Die Zellen wurden 22-24h p.i. mit ^{35}S-Methionin markiert und das Chromatin, wie unter Material und Methoden beschrieben, gewonnen.
Zur Auftrennung in der Flachbett-Fokussierung sollten die Proteine gut gelöst vorliegen, Aggregatbildung muß vermieden werden, da sonst über den IEP der einzelnen Proteine keine Aussage möglich ist.
Deshalb wurden bei dieser Untersuchung Chromatinproben in einem Gemisch aus 10M Harnstoff, 3,5% β-Mercaptoethanol und 1% Triton X-100 mit Ultraschall behandelt. Durch diese Prozedur wird die DNS desinte-

griert und die assoziierten Proteine durch Zusatz von Harnstoff und Detergens abgelöst. Die Zugabe von β-Mercaptoethanol bewirkt die Reduktion der S-S-Brückenbindungen innerhalb eines Proteinmoleküls, wodurch die Proteine in ihre Untereinheiten zerfallen (White,1967). Nach beendeter Fokussierung wurde das Gel in 30 gleichgroße Fraktionen aufgeteilt und der pH-Wert in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Danach wurden die Proteine mit Puffer eluiert und anschließend in der SDS-PAGE analysiert.
In den Abb. 6 und 7 sind die Proteinmuster der einzelnen Fraktionen in der Flachbett-Fokussierung von Kontroll-Chromatin (Abb.6) und SV40-Chromatin (Abb.7) dargestellt. Vom Kontroll-Chromatin werden aus den Fraktionen 13-21 (Abb. 6a) vor allem Proteine mit den Molekulargewichten 48-44K präzipitiert.In der Fraktion 17 (pH 5,79) erscheint ein 97K Protein und in den Fraktionen 18-20 (pH 6,09-6,36) wird ein 62K Protein fokussiert. Die größte Anzahl von Proteinspezies wird in den Fraktionen 25-28 (pH 7,57-8,52), dargestellt in Abb. 6b, nachgewiesen. Hier unterscheidet sich das Proteinmuster der verschiedenen Fraktionen kaum. Die prominentesten Proteinbanden dieser Fraktionen haben folgende Molekulargewichte: 97K, 84K, 75K, 70K, 60K, 58K, 50K,48K, 46K, 42K, 38K, 36K und 25K.

Bei den Proteinen des SV40-Chromatins (Abb.7) zeigt sich, daß bei gleicher Markierung wie bei den Kontrollzellen ein verstärkter Einbau an ^{35}S-Methionin 24 Stunden nach Infektion stattfindet (vergl. I.2).Dies läßt sich besonders an den präzipitierten Proteinen aus den Fraktionen 18-29 (pH 5,29-8,48) mit den Molekulargewichten 46K und 48K verdeutlichen. Auch am Kontroll-Chromatin gibt es in diesem Molekulargewichtsbereich Proteine, sie sind jedoch weniger stark markiert als am SV40-Chromatin. In den Fraktionen 14 und 15 ist am SV40-Chromatin ein 46K Protein stark stimuliert, in den Fraktionen 17-21 ist eine 48K Protein-

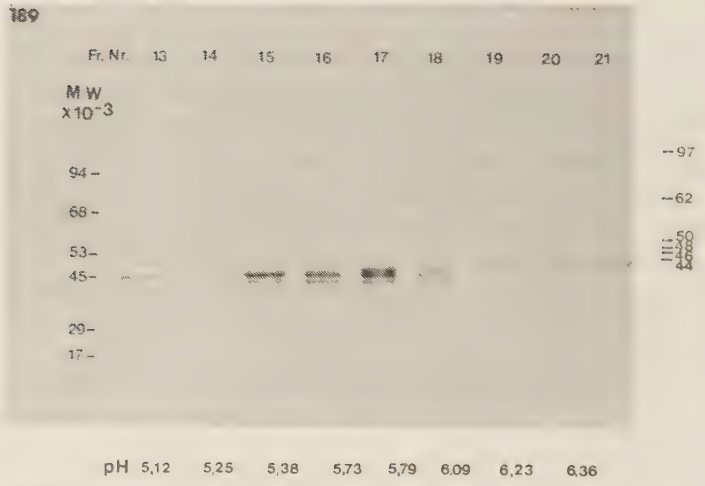


Abb. 6a

Abb. 6b

Abb. 6a/b : Fluorogramm von chromosomalen Proteinen aus schein-infizierten CV-1 Zellen nach Auftrennung in der Flachbett-Fokussierung

Schein- bzw. SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden 22-24h p.i. mit 300 µCi ^{35}S-Methionin pro 5x10^6 Zellen markiert. Nach Chromatingewinnung und Extraktion wurden die Proteine in der Flachbett-Fokussierung aufgetrennt. Die fokussierten MHCP wurden aus dem granulierten Sephadex-Gel eluiert und TCA präzipitiert. Die Analyse einer jeden Fraktion erfolgte in der SDS-PAGE.

Abb. 7a-c : Fluorogramm von chromosomalen Proteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen nach Auftrennung in der Flachbett-Fokussierung

Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 6

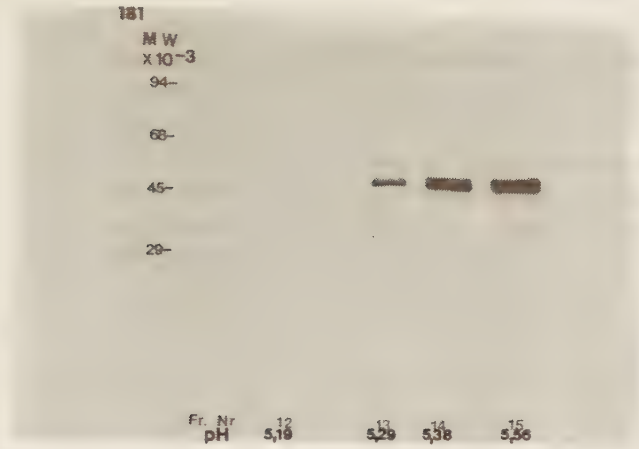


Abb. 7a

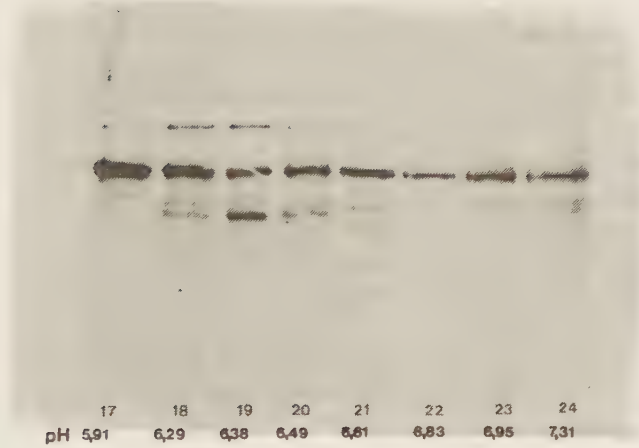


Abb. 7b

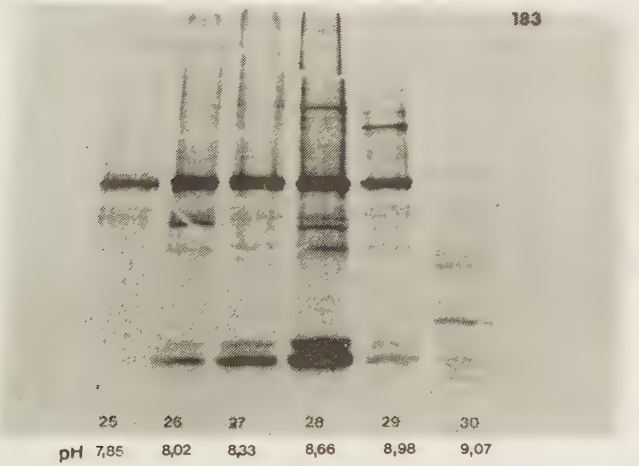


Abb. 7c

bande besonders intensiv. Aus den Fraktionen 26-29 wird ebenfalls ein 48K Protein in angereicherter Form dargestellt. Es erscheint unwahrscheinlich, daß es sich bei den 48K Banden um die gleichen Proteinspezies handelt, da sich die IEP der Proteine um ca. 3 pH-Einheiten unterscheiden.
Aus den Fraktionen 18-20 (pH 6,09-6,36) der Auftrennung des Kontroll-Chromatins wird ein 62K Protein präzipitiert (Abb.6). Ein Protein mit gleichem Molekulargewicht erscheint nach SV40-Infektion besonders stark in den Fraktionen 17-20 (Abb.7). Weiterhin wird ein 97K Protein in der Fraktion 17 des Kontroll- und des SV40-Chromatins nachgewiesen.
Besonders stark stimulierte Proteine des SV40-Chromatins sind neben dem 48K Protein auch solche mit dem Molekulargewicht 38K in den Fraktionen 19 (pH 6,38), 26 (pH 8,02) und 28 (pH 8,66). Gleichfalls aus Fraktion 28 wird ein 34K Protein verstärkt dargestellt. In Fraktion 30 (pH 9,07) erscheinen Proteine mit den Molekulargewichten 29K und 17K als prominente Banden. Im Molekulargewichtsbereich >48K werden aus der Fraktion 28 (pH 8,66) ein 86K Protein und mit schwächerer Intensität ein 80K sowie ein 76K Protein präzipitiert. In der Fraktion 29 (pH 8,98) ist die 76K Proteinbande besonders auffallend, weiterhin weist man nur in dieser Fraktion Proteine mit den Molekulargewichten 84K und 82K nach.

Die Auftrennung der Proteine in der Flachbett-Fokussierung läßt erkennen, daß es durchaus Proteine mit gleichem Molekulargewicht geben kann, die sich in ihrem IEP deutlich unterscheiden (z.B. das 38K Protein in Fraktion 26 und in Fraktion 28). Diesen Unterschied kann man bei der alleinigen Analyse der Proteinproben in der SDS-PAGE nicht erfassen. Ob es sich bei diesen Banden um gleiche Proteine in unterschiedlich derivatisierter Form handelt, kann durch

diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Auch das Auftreten von Proteinbanden mit gleichem Molekulargewicht (z.B. 62K Protein) in homologen Fraktionen der Flachbettfokussierung von Kontroll- und SV40-Chromatin läßt nicht ohne weiteres den Schluß zu, daß es sich bei diesen Banden um die gleichen Proteine handelt. Untersuchungen mit immunologischen Methoden, z.B. mit der Immunpräzipitation, könnten diese Frage klären.

3. Nachweis der Zellysat- und SV40-spezifischen Unterschiede im Muster der Chromatinproteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Am Beispiel der Flachbett-Fokussierung konnte bereits demonstriert werden, daß es erheblich mehr Unterschiede in der Proteinzusammensetzung von Kontroll- und SV40-Chromatin gibt als dies die eindimensionale SDS-PAGE vermuten läßt. Vor allem Proteine, die bei gleichem Molekulargewicht unterschiedliche isoelektrische Punkte besitzen, würden sich in der SDS-PAGE ohne vorherige Fokussierung nur als eine Proteinbande nachweisen lassen.
Die Flachbett-Fokussierung stellt eine Methode der zweidimensionalen Auftrennung dar, die sich vor allem zur präparativen Anreicherung von Proteinen ausgezeichnet eignet. Zur Analyse der Proteinzusammensetzung einer Probe ist diese Methode jedoch zu aufwendig, da die Proteine aus allen 30 Fraktionen eluiert und mit TCA präzipitiert werden müssen. Auch die anschliessende Vorbereitung der Proben und die Durchführung der SDS-PAGE nehmen viel Zeit in Anspruch.
Als weniger aufwendige Methode, die ebenfalls gute Trennung von Proteinen gewährleistet, wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) als analytisches System eingeführt. Bei dieser Methode

wird eine Probe zunächst auf einem Polyacrylamid-Rundgel in Harnstoff bis zu einem pH-Wert, der den IEPs der einzelnen Proteine entspricht, fokussiert (PAGIF). Anschließend folgt in der zweiten Dimension eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine (SDS-PAGE).
Zur näheren Charakterisierung der Proteinspezies wurden pH-Wertbestimmungen an Referenzgelen durchgeführt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden in der SDS-PAGE gleichzeitig Proteine mit definierten Molekulargewichten im gleichen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wie die fokussierten Proteine.

In den folgenden Abschnitten wird der Einfluß eines Hemmstoffs der DNS-Replikation und verschiedener Markierungbedingungen auf die Zusammensetzung der NHCP aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, die mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert wurden, beschrieben.
Ziel dieser Untersuchungen ist die Kennzeichnung der Virusproteine und die Erfassung von SV40-spezifischen Proteinen, die 24h nach Infektion am Chromatin erscheinen. Weiterhin soll zwischen Zellysat- und SV40-spezifischen Effekten bei der Stimulierung von Proteinen am Kontroll- und SV40-Chromatin unterschieden werden und durch 'pulse-chase'-Kinetik bei der radioaktiven Markierung die Verweilzeit einiger Proteine am Chromatin bestimmt werden.

3.1. Einfluß von 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin auf das Proteinmuster nach SV40-Infektion

Durch SV40-Infektion werden in der Zelle Veränderungen in der Proteinzusammensetzung hervorgerufen. Proteine, die abhängig von der Virusinfektion synthetisiert werden, lassen sich in verschiedene Gruppen zusammenfassen:

1) viruscodierte Proteine
2) virusinduzierte Proteine
3) virusstimulierte Proteine

Während die viruscodierten Proteine direkt durch das Virusgenom determiniert sind, werden die virusinduzierten und virusstimulierten Proteine vom Wirtsgenom codiert.
Als virusinduziert sollen solche Proteine bezeichnet werden, die nach SV40-Infektion neu in der Zelle nachzuweisen sind, jedoch nicht zu den bereits bekannten viruscodierten Proteinen zählen. Bei den virusstimulierten Proteinen ist ihr zellulärer Ursprung erwiesen, da sie bereits vor Virusinfektion in der Zelle synthetisiert wurden, nach SV40-Infektion jedoch verstärkt nachzuweisen sind.
Durch die Behandlung von schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen mit 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin (AraC) wird die zelluläre und virale DNS-Replikation reversibel gehemmt (Wist et al., 1976; Manteuil und Girard, 1974). Da die Synthese der Virusstrukturproteine von der viralen DNS-Replikation abhängig ist (Butel und Rapp, 1965), ist es durch Verwendung dieses Hemmstoffs möglich, die Virusstrukturproteine zu identifizieren.

Zur Auftrennung von Chromatinproben aus schein- und SV40-infizierten Zellen nach Behandlung mit AraC wurden die Zellen vor Aufarbeitung für 15 Minuten mit ^{35}S-Methionin-haltigem Medium inkubiert. Darauf folgte ein 30 minütiger 'chase' mit unmarkiertem Methionin im Überschuß, um lösliche Radioaktivität aus der Zelle zu verdrängen.
Die Chromatinproteine wurden durch Zellaufschluß gewonnen und durch Extraktion mit NaCl und DTT von der DNS abgelöst. Nach Präzipitation der Proteine mit TCA und anschließender Lösung über Nacht in PAGIF-Probenpuffer wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.
Die Abbildungen 8a und 8b zeigen das Proteinmuster der

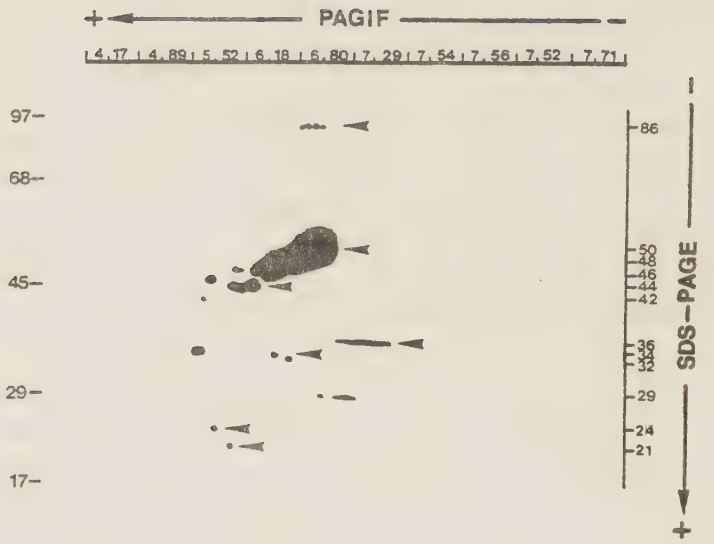

+
PAGIF
−
4,17 | 4,89 | 5,52 | 6,18 | 6,80 | 7,29 | 7,54 | 7,56 | 7,52 | 7,71
97–
68–
45–
29–
17–
86
50
48
46
44
42
36
34
32
29
24
21
SDS–PAGE
+

Abb. 8a

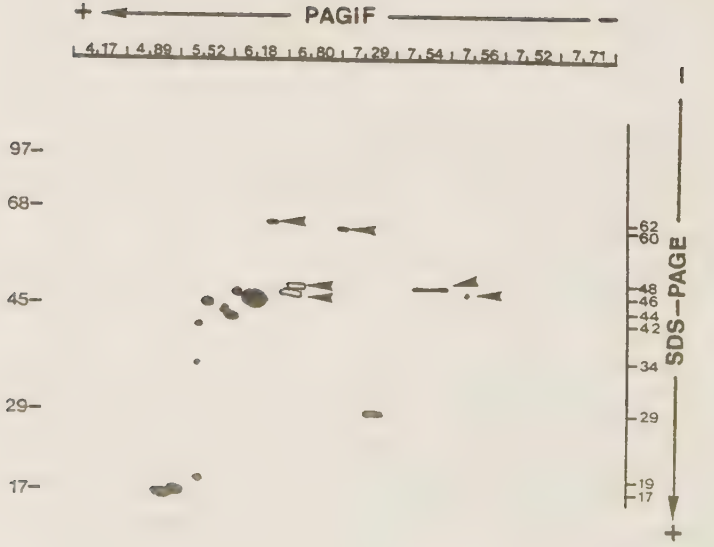

+
PAGIF
−
4,17 | 4,89 | 5,52 | 6,18 | 6,80 | 7,29 | 7,54 | 7,56 | 7,52 | 7,71
97–
68–
45–
29–
17–
62
60
48
46
44
42
34
29
19
17
SDS–PAGE
+

Abb. 8b

Legende zu Abb. 8a

Graphische Darstellung des zweidimensionalen Proteinmusters der NHCP aus SV40-infizierten CV-1 Zellen
SV40-infizierte Zellen wurden 24h p.i. für 15 Minuten mit 200 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert ('pulse') und anschließend für 30 Minuten mit Medium und 300 mg Methionin pro Liter inkubiert ('chase'). Die Chromatinaufarbeitung, Extraktion der Proteine von der DNS und Präzipitation der Proteine durch TCA erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. 35 µg Protein wurden in PAGIF-Probenpuffer gelöst und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zahlen am oberen Bildrand geben den pH-Gradienten des PAGIF-Vergleichgels an. Die Zahlen am rechten Bildrand geben die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wieder.
Die durch Pfeile gekennzeichneten Proteine können nach AraC-Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden.

Legende zu Abb. 8b

Graphische Darstellung des zweidimensionalen Proteinmusters der NHCP aus SV40-infizierten CV-1 Zellen nach AraC-Behandlung
Die Zellen wurden während der Infektion und während des gesamten Zeitraums nach Infektion bis zur Aufarbeitung in einem Medium mit 20 µg Cytosinarabinosid/ml gehalten. Die weiteren experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 8a beschrieben.
Die Pfeile kennzeichnen Proteine, die nach AraC-Behandlung neu am Chromatin der infizierten Zelle erscheinen.

Chromatinproben aus SV40-infizierten CV-1 Zellen, ohne (8a) und mit AraC-Behandlung der Zellen (8b). Zur Erläuterung der Unterschiede im Proteinmuster wurden Schemata angefertigt. Nach der kurzen 'pulse-chase'-Markierung sind nur relativ wenige Proteine durch die zweidimensionale Gelelektrophorese darzustellen.
Die in Abb. 8a durch Pfeile gekennzeichneten Proteine sind nach AraC-Behandlung nicht mehr nachzuweisen. Es handelt sich dabei um Proteine mit den Molekulargewichten 86K, 48K, 44K, 36K, 32K, 29K, 24K und 21K. Diese Proteine sind virusspezifisch,da sie in der scheininfizierten Zelle weder am Chromatin noch im Zytosol nachzuweisen sind (nicht dargestellt). Bei den Proteinen mit den Molekulargewichten 48K, 44K und 32K handelt es sich um die Virusstrukturproteine VP1, VP2 und VP3 (Lazarides et al., 1974), die nach AraC-Behandlung nicht mehr in der Zelle synthetisiert werden (siehe Abb. 8b).
Auch ein 86K Protein, das entsprechend seinem Molekulargewicht, dem isoelektrischen Punkt und nach der Art seiner Auftrennung (streak) eine Form des T-Antigens ist (Crawford und O'Farrell, 1979), wird nach Cytosinarabinosid-Behandlung mit der zweidimensionalen Elektrophorese nicht mehr nachgewiesen.
Als zelluläre, virusinduzierte Spezies werden Proteine mit den Molekulargewichten 36K, 29K, 24K und 21K am Chromatin der infizierten Zelle nicht mehr dargestellt. Wie aus Abb. 8b hervorgeht wird ein 34K Protein nur noch mit reduzierter Intensität nachgewiesen. In dieser Abbildung sind diejenigen Proteine durch Pfeile gekennzeichnet, die nach AraC-Behandlung neu am Chromatin der infizierten Zelle erscheinen. Durch Vergleich mit AraC-behandelten Proben aus scheininfizierten Zellen (nicht dargestellt) zeigt sich, daß bei diesen Proteinen keine virusinduzierten Effekte verstärkt werden, sondern daß ein unspezifischer Stimulus stattgefunden hat, der sich sowohl am Chromatin aus SV40- als auch von scheininfizierten Zellen durch die induzierte Synthese von Proteinen bemerkbar macht.

3.2. Darstellung der chromosomalen Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

Durch die zweidimensionale Auftrennung der NHCP aus SV40-infizierten Zellen nach AraC-Behandlung konnten die Virusstrukturproteine erkannt und die Hemmung weiterer virusinduziérter Proteine nachgewiesen werden.
Nach zweistündiger Markierung der Zellen mit ^{35}S-Methionin sollte durch Vergleich der NHCP-Muster 2h und 24h nach Infektion eine genauere Analyse der Virus- und Zellysat-spezifischen Effekte am Chromatin durchgeführt werden.
Schein und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden 0 - 2h p.i. und 22 - 24h p.i. mit ^{35}S-Methionin markiert und die chromosomalen Proteine nach der gewohnten Methode (siehe Material und Methoden) gewonnen. Die NHCP wurden in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch die längere Markierungzeit (2h) sind bei diesen Untersuchungen mehr Proteine nachzuweisen als am Chromatin der 'pulse-chase'-markierten Zellen (siehe Abb. 8a). Beim Vergleich der Chromatinproteine aus Kontrollzellen (Abb. 9) und SV40-infizierten Zellen (Abb. 10) zwei Stunden nach Infektion läßt sich der verminderte Einbau von ^{35}S-Methionin in die Proteine der SV40-infizierten Zellen (vergl. I.2) direkt nach Infektion verdeutlichen. Während am Kontroll-Chromatin eine grosse Anzahl radioaktiv markierter Proteine nachzuweisen ist, können bei gleicher Proteinmenge am SV40-Chromatin nur wenige markierte Proteine erfaßt werden. Diese Proteinspezies sind nicht SV40-spezifisch, sie können am Kontroll-Chromatin ebenfalls dargestellt werden (vergl. Abb. 9 und Abb. 10).
Die Abbildungen 11 und 12 zeigen das Proteinmuster am Chromatin der scheininfizierten (Abb. 11) und SV40-infizierten CV-1 Zellen (Abb. 12), 24 Stunden nach Infektion.
In den graphischen Darstellungen 11a und 12a wurden

+
PAGIF
-
3,1
3,9
4,7
5,2
5,7
5,9
6,1
6,3
6,5
6,8
7,0
7,05
7,1
7,15
7,25
7,35

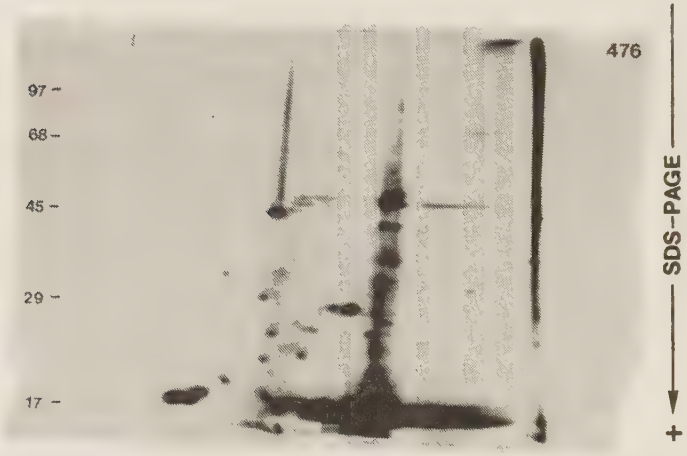
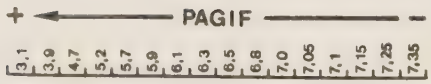

476
97
68
45
29
17
SDS-PAGE
+
-

Abb.9


+
PAGIF
-
3,1
3,9
4,7
5,2
5,7
5,9
6,1
6,3
6,5
6,8
7,0
7,05
7,1
7,15
7,25
7,35

477
97
68
45
29
17
SDS PAGE
+
-

Abb.10

Legende zu Abb. 9

Fluorogramm des zweidimensionalen Polypeptidmusters von Chromatinproteinen aus scheininfizierten CV-1 Zellen 2h p.i.
Schein und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden zu den Zeitpunkten 0h und 22h p.i. für zwei Stunden mit 100 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert. Die Chromatinisolierung erfolgte 2h und 24h p.i.. Die extrahierten und durch TCA präzipitierten Proteine wurden in PAGIF-Probenpuffer gelöst und die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Pro Fokussiergel wurdern 50 µg Protein aufgetrennt.

Legende zu Abb. 10

Fluorogramm des zweidimensionalen Proteinmusters von Chromatinprotein aus SV40-infizierten CV-1 Zellen 2h p.i.
Experimentelle Bedingungen siehe Legende zu Abb. 9

Legende zu Abb. 11

Fluorogramm des zweidimensionalen Proteinmusters von chromosomalen Proteinen aus scheininfizierten CV-1 Zellen 24h p.i.
Experimentelle Bedingungen siehe Legende zu Abb. 9

Legende zu Abb. 12

Fluorogramm des zweidimensionalen Proteinmusters von chromosomalen Proteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen 24h p.i.
Experimentelle Bedingungen siehe Legende zu Abb. 9

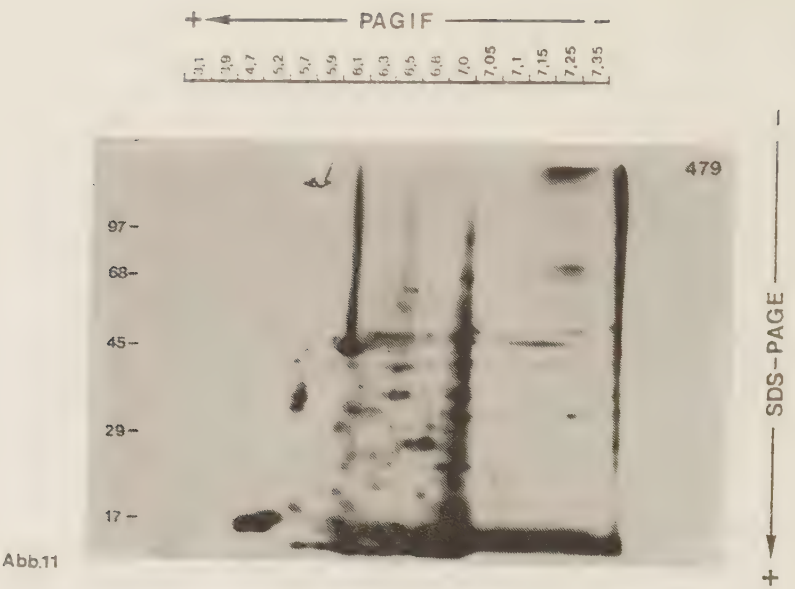


Abb.11

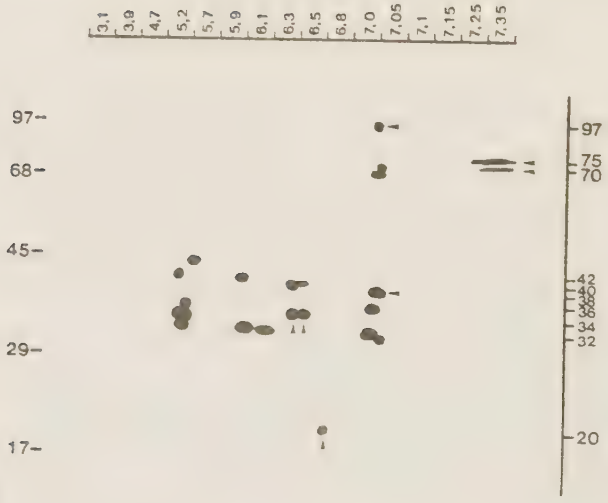


Abb.11 a

Graphische Darstellung der Zellysat-spezifischen Unterschiede im Muster der NHCP 24h p.i.
Die Pfeile kennzeichnen Proteine, die durch das Zellysat stimuliert erscheinen, nach SV40-Infektion jedoch nicht nachzuweisen sind

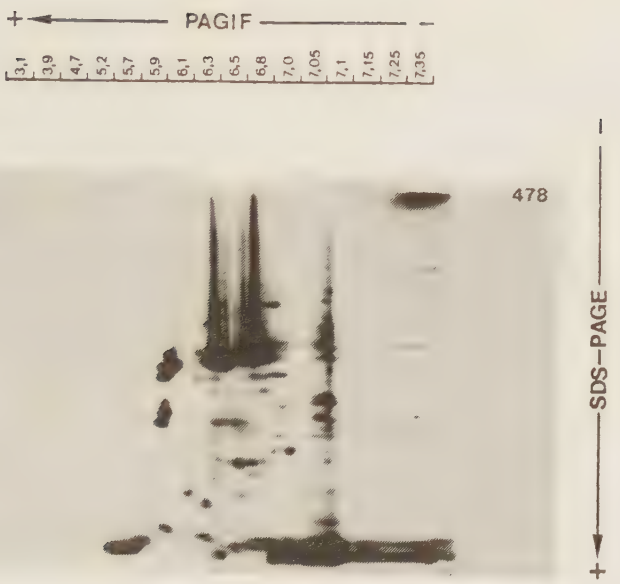


Abb.12

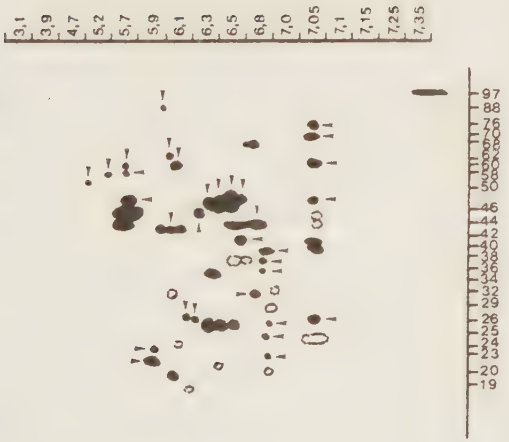


Abb. 12a

Graphische Darstellung der SV40-spezifischen Unterschiede im Muster der NHCP 24h p.i.
Die Pfeile kennzeichnen Proteine, die nach SV40-Infektion neu am Chromatin auftreten. Durch ausgefüllte Flächen sind Proteine dargestellt, die nach Infektion stimuliert erscheinen. Die gepunktet gezeichneten Proteine erscheinen am SV40-Chromatin weniger stark als am Kontroll-Chromatin

die Zellysat- und SV40-spezifischen Unterschiede im Muster der NHCP gezeigt. In Abb. 11a sind diejenigen Proteine erfaßt, die nach Stimulierung der Zellen durch Zellysat (Scheininfektion) neu oder verstärkt am Chromatin auftreten. Dabei werden Proteine, die nur durch Zellysat, nicht jedoch durch SV40-Lysat stimuliert werden,durch Pfeile gekennzeichnet. Da das Zellysat mit Ausnahme der virusspezifischen Bestandteile die gleiche Zusammensetzung hat wie das SV40-Lysat, muß angenommen werden, daß SV40 die Synthese einiger zellulärer Proteine hemmt.

Die SV40-spezifischen Unterschiede im Muster der chromosomalen Proteine werden durch Vergleich der zweidimensionalen Polypeptidmuster von schein und SV40-infizierten Zellen 24h nach Infektion erfaßt.
Abb. 12a zeigt diejenigen Proteine, deren Synthese durch SV40-Infektion verändert ist.
Proteine, die durch Pfeile gekennzeichnet sind, konnten am Kontroll-Chromatin nicht nachgewiesen werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um virusinduzierte NHCP, da sie nur nach Infektion am Chromatin darzustellen sind und in der Zelle neu synthetisiert werden. Hierzu gehört zum Beispiel der viruscodierte VP1-Komplex (pH 6,5-6,8, 50-48K) und Proteine bei pH 7,05 mit den Molekulargewichten 76K, 70K und 60K.
Die ausgefüllten Flächen bezeichnen virusstimulierte Proteine, wie zum Beispiel den Proteinkomplex bei pH 6,3-6,5 mit dem Molekulargewicht 26K. Die Proteine werden nach SV40-Infektion verstärkt synthetisiert und ans Chromatin gebunden.
Die gepunktet gezeichneten Proteine sind nach Infektion in geringerer Konzentration am Chromatin nachzuweisen als in den scheininfizierten Zellen. Als Beispiel dazu sei auf den Proteinkomplex bei pH 7,05 mit dem Molekulargewicht 25K hingewiesen.
Die virusspezifisch synthetisierten Proteine sind

in allen Molekulargewichtsbereichen und von pH 3,9 bis 7,0 zu erfassen. Es lassen sich nach dieser Markierungszeit und mit der beschriebenen Aufarbeitungsmethode am SV40-Chromatin 24h p.i. bei 59 Proteinen Veränderungen gegenüber dem NHCP-Muster der scheininfizierten Zellen (24h p.i.) feststellen. 33 Proteine werden nach SV40-Infektion neu am Chromatin nachgewiesen. 14 der am Kontroll-Chromatin erfaßbaren Proteine liegen am SV40-Chromatin stimuliert vor. 12 Proteine sind nach SV40-Infektion am Chromatin reduziert.
Durch Untersuchung von Zytosolproben der SV40-infizierten Zellen kann ausgeschlossen werden, daß eine Umverteilung der Proteine vom Chromatin ins Zytosol stattgefunden hat. Die am Chromatin reduziert erscheinenden Proteine lassen sich auch im Zytosol nicht nachweisen. Daraus läßt sich schließen, daß ihre Synthese durch SV40 gehemmt wird.

3.3. Veränderungen im Muster der Chromatinproteine nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden

Wie die vorhergehenden Untersuchungen gezeigt haben, lassen sich 24 Stunden nach SV40-Infektion starke Veränderungen in der Zusammensetzung des Chromatins feststellen. Um einige NHCP und dabei besonders die virusinduzierten Proteine näher zu charakterisieren, wurden schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen 24h p.i. für 15 Minuten mit ^{35}S-Methionin markiert ('pulse'). Ein Teil der markierten Zellen wurde sofort aufgearbeitet und das Chromatin gewonnen. Die übrigen Zellen wurden mit Medium, das einen Überschuß an unmarkiertem Methionin enthielt (300 mg/l) für 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten inkubiert ('chase') und nach den jeweiligen Zeitpunkten nach Markierung aufgearbeitet. Die Analyse der Chromatinproben erfolgte in der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Durch die Befunde dieser 'pulse-chase'-Kinetik lassen sich verschiedene Fragen beantworten:

1. Zu welchen Zeitpunkten nach Markierung bindet ein Protein an das Chromatin?
2. Wie groß ist die Verweilzeit eines Proteins am Chromatin?
3. Nach welcher Zeit wird ein Protein wieder vom Chromatin abgelöst?
4. Werden Proteine, die sowohl am Kontroll- als auch am SV40-Chromatin nachzuweisen sind, für den gleichen Zeitraum an das Chromatin gebunden?

Einen Überblick über das Proteinmuster am Chromatin von schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen nach 'pulse-chase'-Markierung mit unterschiedlich langen 'chase'-Perioden geben die schematisierten Darstellungen 13a-m. Insgesamt wurden mehr als 130 Proteine erfaßt, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Markierung am Chromatin nachzuweisen sind.

Bei der Vielfalt der Proteine ist es nicht möglich, auf jedes Protein im einzelnen einzugehen. Deshalb wurde bei der Analyse des Musters auf einige Proteine Bezug genommen,deren Auftreten am Chromatin beispielhaft erscheint. Diese Polypeptide wurden mit Ziffern gekennzeichnet und in Tabelle 2 mit ihrer Verweilzeit am Chromatin zusammengefaßt.

Bei der Betrachtung der Abb. 13a-m lassen sich grundsätzlich folgende Feststellungen machen:

- Viele Proteine binden direkt nach ihrer Synthese an das Chromatin (Abb. 13a, 13b)
- Die größte Anzahl von Proteinspezies ist nach 45 minütigem 'chase' am Chromatin nachzuweisen (Abb. 13g, Kontroll-Chromatin: 73 Polypeptide; Abb. 13h, SV40-Chromatin: 66 Proteinspezies)
- Zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Markierung sind am Kontroll-Chromatin (Abb. 13l) noch 18 Proteine, am SV40-Chromatin noch 31 Proteine nachweisbar (Abb. 13m). Diese Proteine werden hier als stabil gebundene chromosomale Proteine bezeichnet.

15'p - 0'c

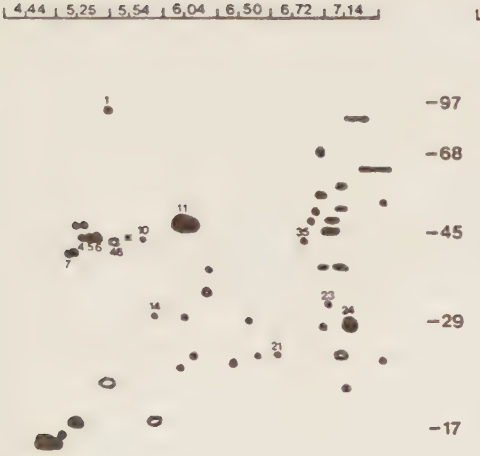


Abb. 13a

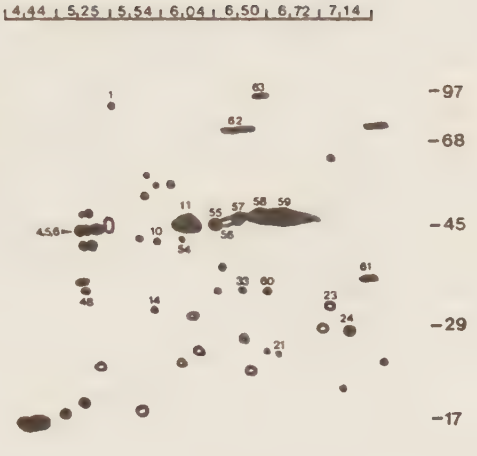


Abb. 13b

15'p - 15'c

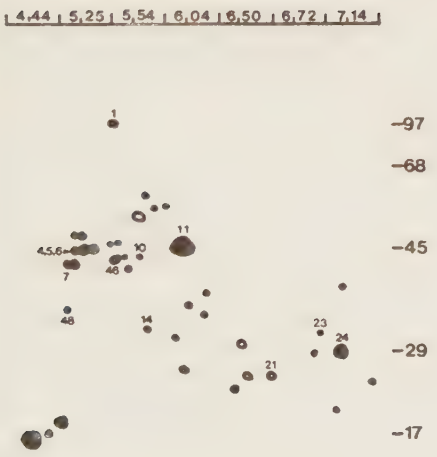


Abb. 13c

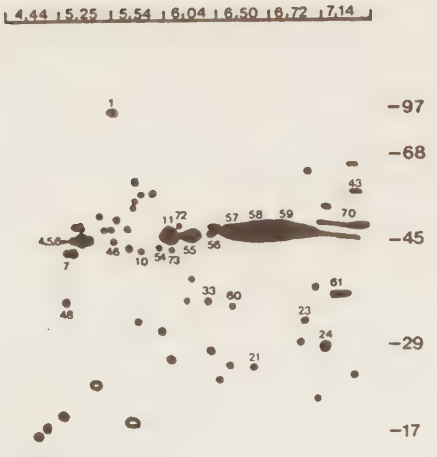


Abb. 13d

Legende zur Abb. 13a-m

Graphische Darstellung des chromosomalen Proteinmusters aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Markierung
Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion für 15 Minuten mit 100 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert. Ein Teil der Zellen wurde sofort aufgearbeitet, die anderen Zellen wurden vor der Chromatinisolierung 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten mit Medium, das mit 300 mg/l Methionin angereichert war, inkubiert. Die Chromatinproben wurden mit Ultraschall behandelt und die DNS durch Nuclease desintegriert. Nach Lyophilisation wurden die Proteinproben in PAGIF-Probenpuffer gelöst und die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Pro PAGIF-Gel wurden 20 µg Protein aufgetrennt.

Abb. 13a : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse', kein 'chase')

Abb. 13b : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', kein 'chase')

Abb. 13c : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse',15 min 'chase')

Abb. 13d : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', 15 min 'chase')

Abb. 13e : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse', 30 min 'chase')

Abb. 13f : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', 30 min 'chase')

Abb. 13g : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse', 45 min 'chase')

Abb. 13h : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', 45 min 'chase')

Abb. 13i : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse', 60 min 'chase')

Abb. 13k : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', 60 min 'chase')

Abb. 13l : Kontroll-Chromatin (15 min 'pulse', 90 min 'chase')

Abb. 13m : SV40-Chromatin (15 min 'pulse', 9o min 'chase')

15'p - 30'c

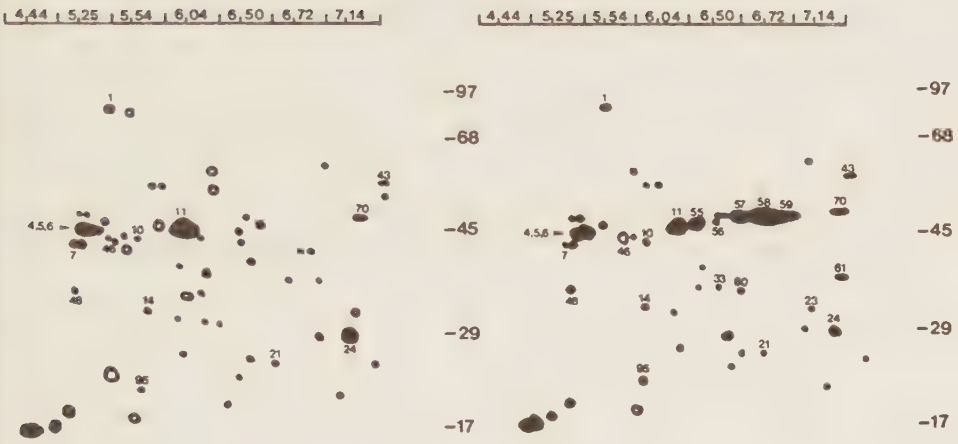


Abb. 13e

Abb. 13f

15'p - 45'c

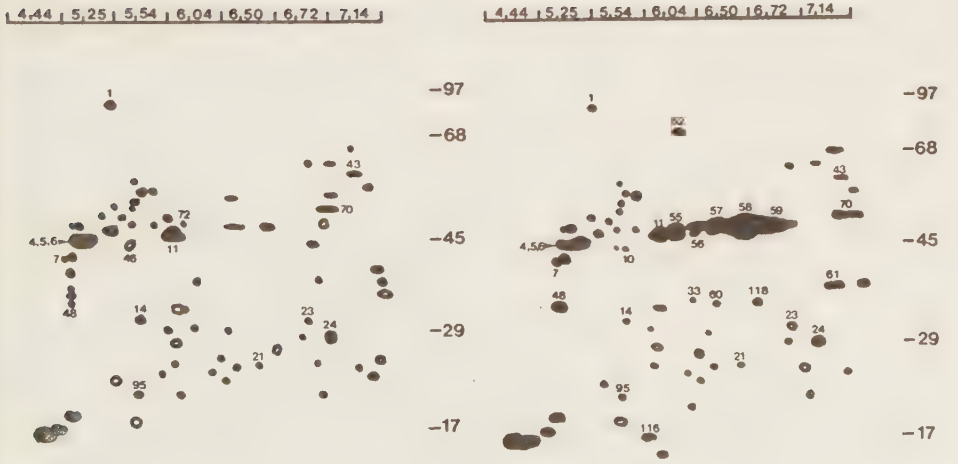


Abb. 13g

Abb. 13h

15'p - 60'c

Abb. 13i

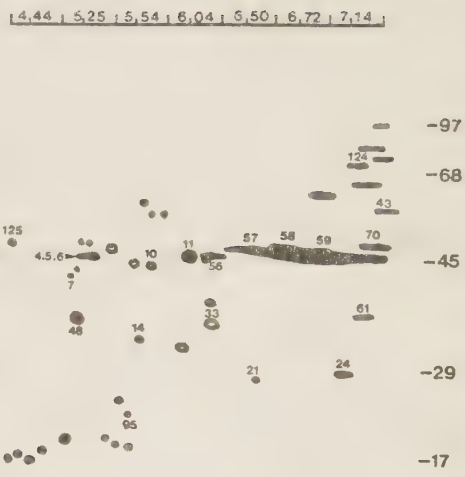


Abb. 13k

15'p - 90'c

Abb. 13l

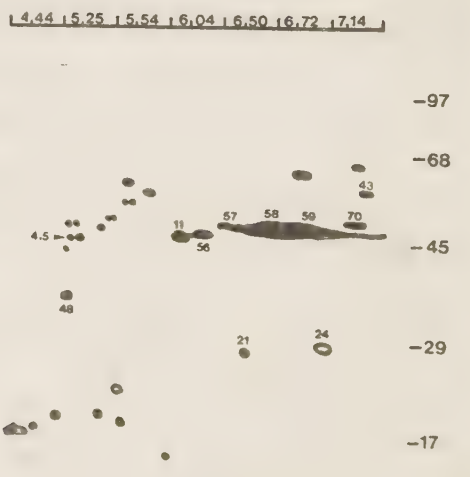


Abb. 13m

Markierung	K 15'p-0'c	SV 15'p-0'c	K 15'p-15'c	SV 15'p-15'c	K 15'p-30'c	SV 15'p-30'c	K 15'p-45'c	SV 15'p-45'c	K 15'p-60'c	SV 15'p-60'c	K 15'p-90'c	SV 15'p-90'c
Proteinnr.												
1	+	+	+	+	+	+	++	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
5	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
6	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	-	-
7	+	+	++	+	++	+	++	++	+	+	+	-
10	+	++	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
11	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
24	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
33	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
46	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
48	-	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
54	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	+
56	-	++	-	++	-	+	-	++	-	+	-	+
57	-	+	-	++	-	+	-	++	-	+	-	+
58	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
59	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
60	-	+	-	+	-	+	-	++	-	-	-	-
61	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	-
62	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
63	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
73	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
116	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabelle 2

Auftreten von NHCP am Chromatin nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden

K : Kontroll-Chromatin
SV : SV40-Chromatin
15'p : 15 minütige 'pulse'-Markierung
0-90'c : 0 bis 90 Minuten 'chase'
+ : Protein nachgewiesen
- : Protein nicht nachgewiesen
++ : Protein mit größerer Konzentration nachgewiesen

Durch das geschilderte Experiment können mehrere Gruppen von NHCP unterschieden werden. Die Gruppencharakteristika werden im folgenden aufgeführt und jeweils durch in Klammern angegebenen Beispiele (siehe Tab. 2) der im Versuch erfaßten Proteine belegt:

1. Proteine, die sofort nach ihrer Synthese während der Markierungszeit an das Chromatin binden
   a) Proteine, die nach 15 minütigem 'chase' nicht mehr nachweisbar sind (35,62,63)
   b) Proteine, die vom Kontroll- und SV40-Chromatin zur gleichen Zeit wieder abgelöst werden (1)
   c) Proteine, die vom Kontroll-Chromatin früher wieder abgelöst werden als vom SV40-Chromatin (10)
   d) Proteine, die vom SV40-Chromatin früher wieder abgelöst werden als vom Kontroll-Chromatin (23)
   e) Proteine, die am Chromatin aus schein- und SV40-infizierten Zellen auch nach 90 Minuten 'chase' noch nachzuweisen sind (11,24)
   f) Proteine, die ans Kontroll-Chromatin stabil binden, am SV40-Chromatin nach 90 Minuten 'chase' jedoch nicht mehr vorliegen (14)
   g) Proteine, die am SV40-Chromatin stabil gebunden sind, am Kontroll-Chromatin nach 90 Minuten 'chase' jedoch nicht mehr nachzuweisen sind (44)
2. Proteine, die nach ihrer Synthese nicht sofort ans Chromatin binden
   a) Proteine, die am Kontroll- und SV40-Chromatin gleichzeitig auftreten (95)
   b) Proteine, die am Kontroll-Chromatin früher auftreten als am SV40-Chromatin (46)
   c) Proteine, die am SV40-Chromatin früher auftreten als am Kontroll-Chromatin (48)
   d) Proteine, die nur für eine 'chase'-Periode (15 Minuten) an das Chromatin binden (72)
   e) Proteine, die länger am Kontroll-Chromatin assoziiert bleiben als am SV40-Chromatin (7)
   f) Proteine, die länger am SV40-Chromatin assoziiert bleiben als am Kontroll-Chromatin (43)

3. Virusinduzierte Proteine, die nur am SV40-Chromatin nachweisbar sind (33,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63, 73,116,118,124,125)
4. Virusstrukturproteine: VP1 (55,56,57,58,59)
   VP2 (54)
   VP3 (33,60)

Durch die Analyse des chromosomalen Proteinmusters zu verschiedenen Zeitpunkten nach Markierung kann deutlich gemacht werden, daß nicht alle Proteine, die während der 'pulse'-Markierung synthetisiert werden, sofort in den Kern transportiert werden, um dort eine stabile Bindung mit dem Chromatin einzugehen.
Es gibt Proteine, die nur für eine kurze Zeit an das Chromatin binden, z.B. die Proteine 35 und62. Sie werden zu anderen 'chase'-Perioden nicht mehr am Chromatin nachgewiesen. Diese Proteine haben eine kurze Halbwertszeit. Ob sie ständig in der Zelle synthetisiert werden oder nur während der kurzen Markierungszeit, kann durch das Experiment nicht geklärt werden.
Die Verweilzeit einiger Proteine am Chromatin scheint durch die Virusinfektion der Zelle beeinflußt zu sein. Proteine, die sowohl in der schein- als auch in der SV40- infizierten Zelle vorkommen, können unterschiedliche Verweilzeiten am Chromatin haben. Sei es, daß sie bereits nach einer kürzeren 'chase'-Periode am Chromatin nachzuweisen sind (s. Protein 48), oder sei es, daß Proteine aus SV40-infizierten Zellen länger oder kürzer an die DNS gebunden sind als die entsprechenden Proteine aus scheininfizierten Zellen (10,23,43,44).

Bei den Proteinen, die stabil an das Chromatin binden, hat es den Anschein, daß sie zum Teil Strukturelemente der Kernmatrix bilden, die einem geringen Katabolismus in der Zelle unterliegen (Fine und Taylor, 1976). Diese Proteine (11,24) kommen in der schein- und in der SV40-infizierten Zelle in gleichen Mengen vor und sind auch nach zweistündigem 'chase' noch mit dem Chromatin verbunden. Für das Protein 11 kann nach Vergleich des

IEP, des Molekulargewichts und der Form der Auftrennung geschlossen werden, daß es sich um Aktin handelt (Milavetz et al., 1980).
Eine andere Gruppe von Proteinen, die relativ stabil ans Chromatin bindet, stellen die Virusstrukturproteine dar. VP1 (siehe Tab. 2, Proteinnr. 55,56,57,58,59) besteht aus mehreren Untereinheiten (O'Farrell und Goodman, 1976). Während der 15 minütigen Markierungszeit wird VP1 im Zytosplasma synthetisiert und sofort in den Kern transportiert. Hier bindet es an das Chromatin, wobei die Untereinheiten 58 und 59 auch nach zwei Stunden 'chase' noch mit der gleichen Intensität nachzuweisen sind wie direkt nach der Markierung. Die Proteine 55, 56 und 57 sind nach 60 Minuten 'chase' weniger stark am Chromatin darstellbar als nach kürzeren 'chase'-Perioden. Die Untereinheiten von VP1 haben also unterschiedliche Verweilzeiten am Chromatin.
Gleiches ist auch für die Virusstrukturproteine VP2 und VP3 zu sagen. Während VP2 (54) nur für kurze Zeit mit dem Chromatinkomplex verbunden ist (Ablösung nach 15 Minuten 'chase'), bleibt VP3 (33,60) bis zum Zeitpunkt 45 Minuten nach Markierung ans Chromatin gebunden.

Neben den Virusstrukturproteinen zeigen sich aber auch eine Reihe von virusinduzierten Proteinen, die nur in der infizierten Zelle nachzuweisen sind (61,62,63,73, 116,118,124,125). Sie sind meist nur für kurze Zeit mit dem DNS-Proteinkomplex verbunden. Da die meisten dieser Proteine zellulären Ursprungs sind und damit im Mittelpunkt des Interesses stehen, sollen hier die einzelnen Proteine ausführlicher beschrieben werden.
Das Protein 61 (36K) bindet stabil an das Chromatin und ist auch nach 60 minütigem 'chase' noch nachweisbar. Protein 62 (72K) und 63 (90K) erscheinen bereits während der Markierungszeit am Chromatin und sind nach 15 minütigem 'chase' nicht mehr am Chromatin darstellbar. Ein Protein mit gleichem IEP und Molekulargewicht wie das mit 62 bezeichnete, erscheint jedoch nochmals 45

Minuten nach Markierung. Dieses Protein liegt möglicherweise in verschiedenen Zustandsformen in der Zelle vor.
Das Protein 63 wird ebenfalls nur kurz ans Chromatin gebunden. Es ist 15 Minuten nach Markierung bereits wieder vom Chromatin abgelöst.
Das Protein 73 (44K) erscheint erst nach 15 minütigem 'chase' am Chromatin und ist nach 30 Minuten 'chase' nicht mehr nachweisbar.
Die Proteine 116 (17K) und 118 (32K) liegen nach 45 Minuten 'chase' am Chromatin vor. Sie haben genau wie die Proteine 124 (70K) und 125 (50K) stabile Vorstufen im Zytoplasma, die erst nach längerer Verweilzeit im Zytosol ihre Funktion erfüllen.

Durch das oben dargestellte Experiment können während eines Markierungszeitraumes von 15 Minuten mit anschliessender Aufarbeitung nach verschieden langen 'chase'-Zeiten eine große Anzahl SV40-spezifischer Veränderungen im NHCP-Muster nachgewiesen werden. Durch Untersuchungen zu anderen Zeitpunkten nach Infektion in der oben beschriebenen Form könnte wahrscheinlich eine nicht zu übersehende Anzahl von weiteren Proteinen dargestellt werden, deren Auftreten am Chromatin SV40-spezifisch induziert wird.
Wie diese Untersuchungen verdeutlichen, ist die Identifizierung von virusspezifischen Veränderungen im NHCP-Muster unter anderem abhängig von der Wahl der Nachweismethode (dabei erwies sich die zweidimensionale Auftrennung als wesentlich empfindlicher als die SDS-PAGE), vom Zeitpunkt nach Infektion, von der Markierungszeit und vom Zeitpunkt der Aufarbeitung nach radioaktiver Markierung.

III. Nachweis virusspezifischer Nicht-Histon-Chromatinproteine mittels immunologischer Methoden

Nachdem durch verschiedene analytische Nachweismethoden am Chromatin SV40-infizierter Zellen, in Abhängigkeit vom Zeitraum nach Infektion und zu verschiedenen Zeiten nach radioaktiver Markierung, eine Reihe von Unterschieden im Proteinmuster der NHCP festgestellt wurden, soll nun an Hand von immunologischen Methoden eine Analyse der chromosomalen Proteine zu verschiedenen Zeiten nach Infektion durchgeführt werden.
Dazu wurden in verschiedenen Tierspezies Antikörper gegen lytisch infizierte und transformierte Zellen, gegen SV40-Virionen und gegen Chromatin aus infizierten und transformierten Zellen hergestellt.
Als immunologische Nachweismethode zur Identifizierung virusspezifischer Proteinspezies wurde die Immunpräzipitation mit anschließender Analyse des Proteinmusters in der SDS-PAGE oder in der zweidimensionalen Gelelektrophorese gewählt. Weitere Methoden zum Nachweis virusspezifischer Proteine, die zur Charakterisierung der Immunseren eingesetzt wurden, sind die indirekte Immunfluoreszenz und der Neutralisationstest.

1. Charakterisierung der Immunseren durch Immunfluoreszenz und Neutralisationstest

Zum Nachweis virusspezifischer NHCP durch Immunpräzipitation wurden folgende Antiseren im Experiment verwendet:

1. Hamsterseren gegen SV40-induzierte Tumore
2. Ziegenserum gegen gereinigte Viruspartikel
3. Affenserum gegen SV40-infizierte autologe Affennierenzellen
4. Kaninchenseren gegen Chromatinproteine

a) aus scheininfizierten CV-1 Zellen, 24h p.i.
b) aus SV40-infizierten CV-1 Zellen zu den Zeitpunkten 6, 12, 18, 24 und 48h p.i.
c) aus NKS-stimulierten CV-1 Zellen, 24h p.i.
d) aus SV40-transformierten Affennierenzellen (AGMK-EVa)

Von jeder Tierspezies wurde zunächst ein Praeimmunserum gewonnen, das zur Kontrolle bei den immunologischen Untersuchungen eingesetzt wurde, um unspezifische Immunreaktionen auszuschließen.
Durch Überprüfung der Antiseren in der indirekten Immunfluoreszenz und im Neutralisationstest kann festgestellt werden, ob die Immunseren Antikörper gegen SV40-spezifische Antigene enthalten.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz weist man mit Hilfe von Aceton-fixierten Antigenen, in diesem Fall SV40-infizierte CV-1 Zellen 48h p.i. und transformierte AGMK-EVa Zellen, Antikörper im Serum nach. Durch Zugabe von fluoreszierenden Anti-Antikörpern können die Antigen-Antikörper-Komplexe im Fluoreszenzmikroskop in der Zelle sichtbar gemacht werden. Mit den hier ausgetesteten Antiseren ließen sich vornehmlich Antigene im Zellkern nachweisen.
In den Abbildungen 14a-e sind die typischen Fluoreszenzen einiger Antiseren dargestellt.
Die Abbildung 14a zeigt die starke Kernfluoreszenz des Antiserums gegen SV40-Chromatin 24h p.i. (Anti 24h-SV40-Chromatin) nach Inkubation mit SV40-infizierten CV-1 Zellen 48h p.i.. Die Zellkerne sind bei diesem Serum stark angefärbt, nur die Nukleoli sind ausgespart. Gegen zytoplasmatische Proteine sind in diesen Antiseren keine Antikörper vorhanden. Das spricht für die Reinheit der Chromatinpräparation zur Immunisierung der Kaninchen. Antiseren gegen Kontroll-Chromatin zeigen hingegen nur eine schwache Kernfluoreszenz (nicht gezeigt). Die SV40-spezifischen Proteine scheinen am Chromatin besonders immunogen zu wirken.

Abb. 14a

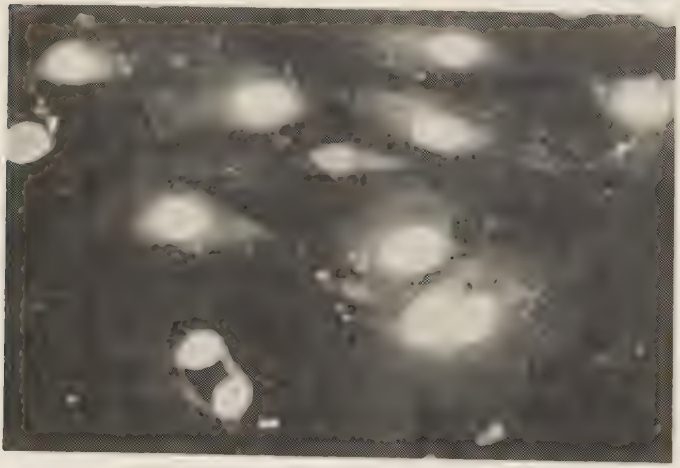


Abb. 14b

Abb. 14d

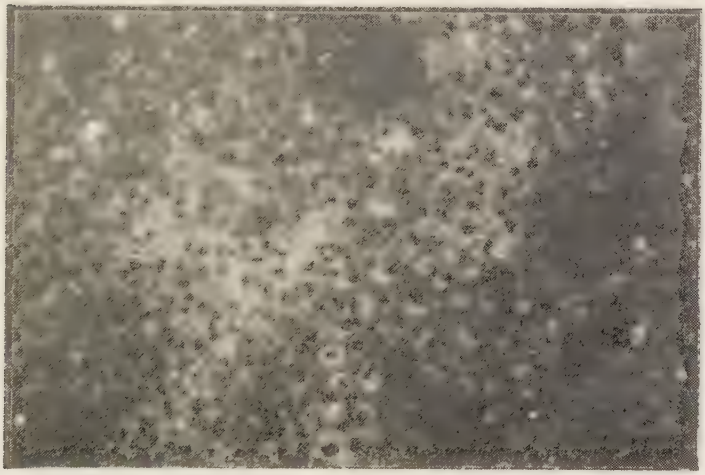


Abb. 14e

Abb. 14a-e

Nachweis von virusspezifischen Proteinen mit der indirekten Immunfluoreszenz
SV40-infizierte CV-1 Zellen (bzw. AGMK-EVa-Zellen) wurden 48h p.i. mit Aceton fixiert. Im ersten Schritt wird ein Immunserum mit den Zellen inkubiert. Danach wird ein FITC-konjugiertes Antiserum gegen das Immunserum eingesetzt.

Abb. 14a: SV40-CV-1 Zellen, 48h p.i. / Kaninchen Anti 24h SV40 Chromatinserum

Abb. 14b: SV40-CV-1 Zellen, 48h p.i. / Affenserum gegen SV40-infizierte autologe Nierenzellen

Abb. 14c: SV40-CV-1 Zellen, 48h p.i. / Ziegenserum gegen SV40-Virionen, voradsorbiert auf CV-1 und AGMK-EVa Zellen

Abb. 14d: SV40-CV-1 Zellen, 48h p.i., AraC-behandelt / Hamster-Anti-T-Serum

Abb. 14e: AGMK-EVa Zellen / Ziegenserum, adsorbiert (s.o.)
Vergrößerung: 350-fach bzw. 140-fach bei Abb. 14e

Starke Kernfluoreszenz mit leicher Zytoplasmafluoreszenz zeigt das Affenserum (Abb. 14b). Durch Injektion autologer, SV40-infizierter Nierenzellen werden im Affen SV40-spezifische Antikörper gegen Antigene induziert, die im Kern und im Zytosplasma lokalisiert sind. Wie beim Kaninchenserum werden auch beim Affenserum die Nukleoli nicht angefärbt.
Eine Immunfluoreszenz mit dem Ziegenserum, nach Voradsorption auf CV-1 Zellen und AGMK-EVa Zellen zur Eliminierung der zellulären und T-Antigen-spezifischen Antikörper, zeigt Abbildung 14c. Die Zellkerne zeigen eine starke Randfluoreszenz. Ohne Voradsorption des Serums auf AGMK-EVa Zellen zeigt das Serum das gleiche Fluoreszentmuster wie das Affenserum (nicht gezeigt).
Überprüft man diese Seren auf AraC-behandelten, SV40-infizierten CV-1 Zellen, so zeigt das voradsorbierte Ziegenserum keinerlei Fluoreszenz mehr. Daraus kann geschlossen werden, daß die Fluoreszenz, die in Abbildung 14c dargestellt wurde, spezifisch für die Virusstrukturproteine ist.
Die Antiseren, bei denen ein hoher Antikörpertiter gegen die Tumorantigene T und t erwartet wird (Hamsterserum, Affenserum) zeigen, ebenso wie die Kaninchen Anti-Chromatinseren, nach AraC-Behandlung der infizierten Zellen nur noch eine schwache Kernfluoreszenz (siehe Abb. 14d).

Führt man die Immunfluoreszenz mit voradsorbiertem Ziegenserum auf AGMK-EVa Zellen durch (Abb. 14e), erscheinen die Zellkerne völlig dunkel, nur im Zytoplasma sind einige Regionen unspezifisch angefärbt. Dies ist der Beweis, daß in der SV40-transformierten AGMK-EVa Zelle keine Virusstrukturproteine im Zellkern lokalisiert sind.
Die Praeimmunseren zeigten keine Fluoreszenz.

Alle zur Immunfluoreszenz und zur Immunpräzipitation eingesetzten Antiseren wurden im Neutralisationstest auf ihre Fähigkeit, die Virusinfektion zu hemmen, untersucht. Protein, die bei diesem Test als Antigene zur Verfügung stehen, sind die Viruscapsidproteine. Meine Annahme ist

es, daß durch Anti-VP1-Antikörper eine Komplexierung der Viruspartikel stattfindet, durch die eine Infektion der Zellen verhindert wird.
Im Neutralisationstest haben sich folgende Antiseren als negativ erwiesen:

1. Seren der Tiere vor Immunisierung (Praeimmunseren)
2. Antiseren gegen Chromatin aus scheininfizierten CV-1 Zellen
3. Antiseren gegen Chromatin aus NKS-stimulierten CV-1 Zellen
4. Antiseren gegen SV40-Chromatin 6h, 12h und 18h p.i.
5. Antiseren gegen AGMK-EVa-Chromatin
6. Hamster Anti-T Seren

Durch die Tatsache, daß die unter 5 und 6 genannten Antiseren keine neutralisierenden Antikörper aufweisen, wird die Hypothese unterstützt, daß die in diesem Test nachgewiesenen Antikörper gegen Virusstrukturproteine gerichtet sind, von denen bekannt ist, daß sie in transformierten Zellen nicht vorliegen (Shiroki und Shimojo, 1971).
Im folgenden sind die maximalen Antikörpertiter derjenigen Antiseren aufgeführt, die SV40-neutralisierende Effekte zeigen:

Antiserum	Titer
Anti 0h SV40-Chromatin	270
Anti 24h SV40-Chromatin	537
Anti 48h SV40-Chromatin	680
Ziegenserum	1.280
Affenserum	320

Die Anti 24h und 48h SV40-Chromatinseren enthalten neutralisierende Antikörper gegen SV40. Bei den frühen Anti-Chromatinseren 6h, 12h und 18h p.i. hat VP1 noch nicht in ausreichenden Mengen am Chromatin vorgelegen,

um einen antigenen Stimulus auszuüben. Das Anti Oh SV40-Chromatinserum enthält jedoch bereits neutralisierende Antikörper. Dies läßt darauf schließen, daß VP1 nach Infektion der Zellen mit SV40 im Zellkern freigesetzt wird und an die DNS bindet. Bei der Isolierung des SV40-Chromatins Oh p.i. liegt VP1 als chromosomales Protein vor und wird mit den NHCP den Kaninchen zur Immunisierung verabreicht.

2. Untersuchungen von viruscodierten Proteinen am Chromatin und im Zytosol von SV40-infizierten CV-1 Zellen nach Immunpräzipitation

Durch den Nachweis in der Immunfluoreszenz und im Neutralisationstest konnten SV40-spezifische Antikörper in verschiedenen Immunseren festgestellt werden.
Um nun die Frage zu klären, gegen welche Antigene diese Antikörper gerichtet sind, muß eine andere Methode zur Darstellung von Immunreaktionen angewendet werden. Hierbei schien die Protein A-Adsorbens Technik (Immunpräzipitation), mit der Analyse der Antigen-Antikörper-Komplexe in der SDS-PAGE das geeignete Verfahren zu sein.
Durch Immunpräzipitation von chromosomalen Proteinen aus SV40-infizierten Zellen mit Antiseren von Tieren, die gegen SV40-spezifische Proteine Antikörper gebildet hatten (gegen T-Antigen und gegen Virusstrukturprotein), sollte festgestellt werden, ob der immunologische Nachweis von viruscodierten Proteinen am Chromatin mit diesen Antiseren gelingt.
Des weiteren sollte das Auftreten von virusindizierten Proteinen am Chromatin und im Zytosol der infizierten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion bestimmt werden.

2.1. Nachweis von T-Antigen und Virusstrukturproteinen mit verschiedenen Antiseren

Mit Hilfe der Immunpräzipitation sollen viruscodierte Proteine wie T-Antigen (T und t) und Virusstrukturproteine am Chromatin und aus dem Zytosol von SV40-infizierten CV-1 Zellen dargestellt werden.
Durch Inkubation von Proteinproben mit Antiseren werden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet, die nach Zugabe von Staphylococcus aureus an das Zellwandprotein A des Bakteriums gebunden werden und so nach Zentrifugation isoliert werden können. Da bei dieser Methode mit radioaktiv markierten Proteinen als Antigen gearbeitet wird, sind nach Auftrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe in der SDS-PAGE und Fluorographie der Gele nur die markierten, immunpräzipitierten Proteine zu erfassen. Zur Präzipitation von T-Antigen wurden zwei Antiseren eingesetzt:

1. Hamster Anti-T-Serum von Tieren, die nach Injektion von SV40-transformierten H65/90B Zellen Tumore entwickelt hatten. Diese Seren enthalten erfahrungsgemäß hohe Antikörpertiter gegen T- und t-Antigen (Carroll und Smith, 1976)
2. Affenserum gegen autologe SV40-infizierte Affennierenzellen. Auch bei dem Affenserum ist zu erwarten, daß es Antikörper gegen T-Antigen enthält, da dieses Antigen in den infizierten primären Affennierenzellen synthetisiert wird.

Beide Antiseren zeigten nach Inkubation auf SV40-infizierten CV-1 Zellen in der Immunfluoreszenz die für das T-Antigen typische Kernfluoreszenz (vergl. Abb. 14b).

Zur Immunpräzipitation wurden extrahierte Chromatinproteine und Zytosolproben aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen mit dem Hamsterserum inkubiert. Abbildung 15 zeigt das Muster der präzipitierten Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE.

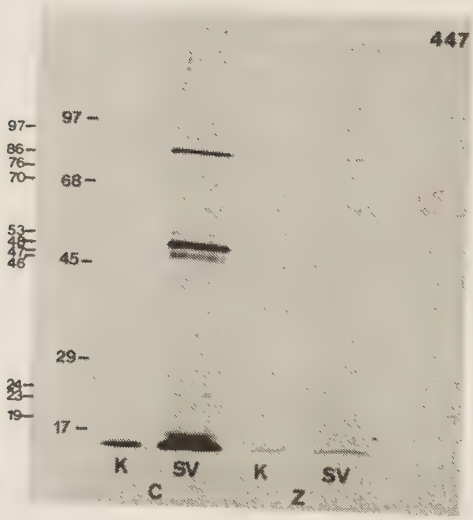


Abb. 15

Fluorogramm des Proteinmusters aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen nach Immunpräzipitation mit Hamster Anti T-Serum

Die Zellen wurden vor Aufarbeitung, 24h p.i., mit 100 µCi ^{35}S-Methionin pro 5x10^{6} Zellen markiert (15 Minuten 'pulse' - 30 Minuten 'chase'). Die extrahierten Chromatin- und Zytosolproteine aus schein- und SV40-infizierten Zellen wurden vor der Immunpräzipitation mit Hamsternormalserum adsorbiert. Die Immunpräzipitation wurde mit Hamster Anti T-Serum durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt.
C : Chromatin
Z : Zytosol
K : scheininfiziert
SV: SV40-infiziert

Von den Proteinen des SV40-Chromatins werden Polypeptide mit den Molekulargewichten 97K, 86K, 76K, 70K, 53K, 48K, 47K, 46K, 24K und 23K präzipitiert. Am Kontroll-Chromatin konnten keine SV40-spezifischen Proteine nachgewiesen werden.
Mit besonders großer Konzentration wird das 86K Protein vom Hamsterserum immunpräzipitiert. Vergleiche mit Literaturbefunden (Lane und Robbins, 1978; Prives et al., 1977) lassen darauf schließen, daß es sich bei diesem Protein um T-Antigen handelt.
Das t-Antigen ist am Chromatin mit diesem Antiserum nicht nachzuweisen.
Auffallend stark wird mit dem Hamsterserum ein 48K Protein präzipitiert. Nach seiner elektrophoretischen Mobilität zu urteilen, kann es sich dabei um das Virusstrukturprotein VP1 handeln.
Um diese Frage zu klären wurden Immunpräzipitate von SV40-Chromatinproben mit Hamsterserum in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt.In Abb. 16 ist das Muster der präzipitierten Proteine dargestellt. Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich Proteine mit den Molekulargewichten 86K, 76K, 70K, 48K und 46K nachweisen. T-Antigen (86K), dessen IEP mit 6,5-6,9 angegeben wird (Crawford und O'Farrell, 1979) kann in der ersten Dimension nicht bis zu seinem IEP fokussiert werden. Möglicherweise bildet das T-Antigen Aggregate, die durch den PAGIF-Probenpuffer nicht vollständig gelöst wurden. Von ähnlichen Schwierigkeiten bei der zweidimensionalen Auftrennung von T-Antigen wurde auch von Crawford und O'Farrell (1979) berichtet. In der zweiten Dimension der SDS-PAGE konnte das Protein nach Inkubation mit SDS und β-Mercaptoethanol jedoch seinem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Ähnliche Gründe sind möglicherweise auch für das Verhalten des 76K Proteins bei der Auftrennung verantwortlich. Bei dem 48K-Komplex, der bei der Untersuchung der Immunpräzipitate in der SDS-PAGE nachzuweisen war, handelt es sich tatsächlich um VP1, sein IEP

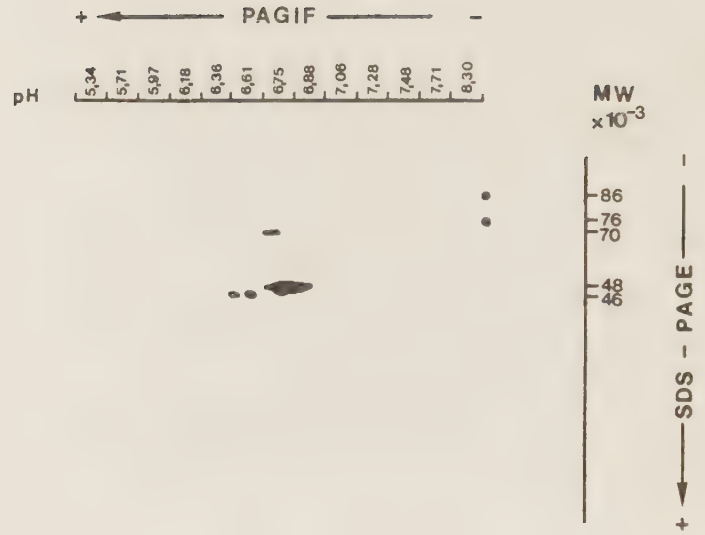


Abb. 16

Darstellung von SV40-Chromatinproteinen, 24h p.i., nach Immunpräzipitation mit Hamster Anti T-Serum und Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese
SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden zwei Stunden vor Aufarbeitung (24h p.i.) mit 250 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen radioaktiv markiert. Nach Chromatinisolierung und Extraktion wurden die Proteine mit Hamsternormalserum adsorbiert und die Immunpräzipitation mit Hamster Anti T-Serum durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden durch SDS und DTT von den Staphylokokken abgelöst und die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt.

und die Darstellung des Proteins in der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen diesen Schluß zu (O'Farrell und Goodman, 1976).
Durch Inkubation von markierten Chromatinproteinen ohne Zugabe von Immunserum mit Staphylococcus aureus konnte eine starke Affinität von VP1 zur Staphylokokkenoberfläche nachgewiesen werden. Da das Hamsterserum keine Antikörper gegen Virusstrukturproteine enthält, muß VP1 unspezifisch präzipitiert worden sein.

Einige der Proteinspezies, die bei der eindimensionalen Darstellung des Immunpräzipitats nachweisbar waren, können in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht erfaßt werden. Dabei handelt es sich um Proteine, die zu schwach markiert sind, um mit dieser Methode dargestellt zu werden.

Aus dem Zytosol der SV40-infizierten Zellen werden die Proteine mit den Molekulargewichten 86K (T-Antigen), 46K und 19K präzipitiert. Bei dem 46K Protein handelt es sich wahrscheinlich um ein zelluläres Protein, das auch mit Hamster-Normalserum unspezifisch präzipitiert wird. Das 19K Protein entspricht dem t-Antigen, das im Zytosol nachzuweisen ist (Ito et al., 1977).

Mit dem Affenserum werden vom Chromatin im wesentlichen die gleichen Proteine präzipitiert wie mit dem Hamsterserum (vergl. Abb. 18). Mit Hilfe dieses Serums sollte der Zeitpunkt nach Infektion eingegrenzt werden, zu dem T-Antigen mittels der Immunpräzipitation in der Zelle nachgewiesen werden kann.
Durch die Aufarbeitung von schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen zu den Zeitpunkten 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h p.i., nach 'pulse (15 min) - chase (30 min)' Markierung mit ^{35}S-Methionin und Immunpräzipitation mit Affenserum, zeigt sich im Muster der präzipitierten Proteine deutlich eine Zunahme der Synthese einiger Proteine.
In Abb. 17 sind die Proteine des Kontroll- und SV40-

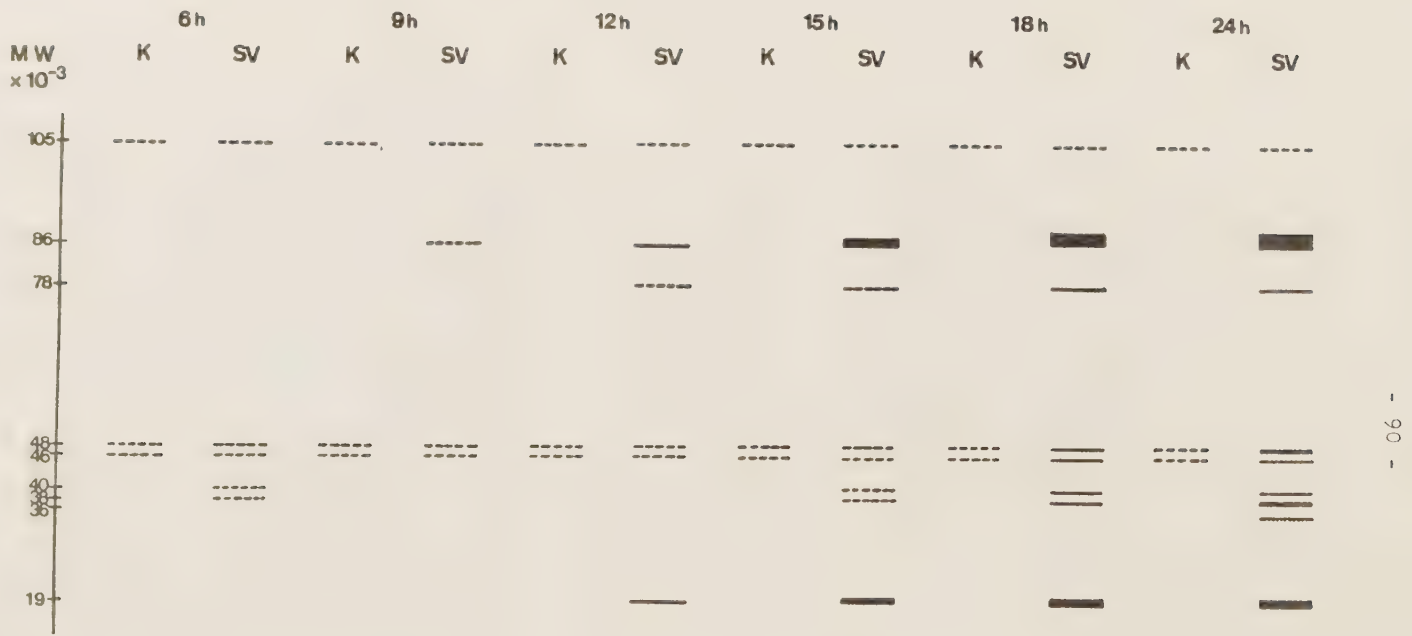


Abb. 17

Schematisierte Darstellung der SDS-PAGE-Fluorogramme von Immunpräzipitaten der Zytosolproben aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, 6h bis 24h p.i., mit Immunseren vom Affen
Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden vor Aufarbeitung mit 300 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert (10 Minuten 'pulse' - 30 Minuten 'chase'). Die Zytosolproteine wurden zu den Zeitpunkten 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h gewonnen und die Proben vor der Immunpräzipitation mit Affenkontrollserum adsorbiert. Ebenso wurde das Immunserum zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen auf CV-1 Zellen vor-adsorbiert.
K : Kontroll-Zytosol; SV : SV40-Zytosol; 6h, 9h, 12h usw. : Zeitpunkte der Aufarbeitung p.i.

Zytosols, die durch Immunpräzipitation mit dem Affenserum erfaßt werden, in schematisierter Form dargestellt.
T-Antigen (86K) ist bereits neun Stunden nach Infektion im Zytosol der infizierten Zellen nachzuweisen. t-Antigen (19K) erscheint 12 Stunden nach Infektion erstmals im Zytosol. T- und t-Antigen werden bis zum letzten Zeitpunkt des hier untersuchten Zeitraums nach Infektion immer stärker präzipitiert.
Ab der 6. Stunde p.i. werden im SV40-Zytosol Proteine nachgewiesen, die möglicherweise vom zellulären Genom codiert sind und deren Synthese SV40-spezifisch induziert wird. Hier sind Proteine mit den Molekulargewichten 78K, 40K, 38K und 36K zu nennen. Mit der 18. Stunde nach Infektion wird ein Protein mit einem Molekulargewicht von 48K verstärkt dargestellt. Hierbei handelt es sich möglicherweise um VP1-Moleküle, die nach ihrer Synthese im Zytosol noch nicht in den Kern transportiert wurden.
Durch Immunpräzipitation von SV40-Zytosolproben können mit dem Affenserum mehr Proteinklassen erfaßt werden als mit dem Hamster Anti T-Serum (vergl. Abb. 15 und 17). Während in den Hamstern vor allem Antikörper gegen T- und t-Antigen induziert wurden, konnten durch Immunisierung des Affen mit lytisch infizierten Zellen auch Antikörper gegen SV40-indizierte zytoplasmatische Proteine gewonnen werden.
Durch Immunpräzipitation von extrahierten Chromatinproteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen (nicht dargestellt) konnte T-Antigen ab der 15. Stunde nach Infektion nachgewiesen werden. Wie bei den Präzipitationsversuchen mit dem Hamsterserum konnte t-Antigen am Chromatin der infizierten Zelle auch mit dem Affenserum nicht nachgewiesen werden.

Nach den T-Antigenspezies sollen nun die Virusstrukturproteine durch Immunpräzipitation mit Ziegenserum (IgG-Fraktion) gegen SV40-Virionen dargestellt werden.

SV40 wurde über einen KBr- und CsCl-Gradienten gereinigt und angereichert. Die Virusbande wurde isoliert und eine Ziege mit den Virionen immunisiert und geboostert. Aus dem Antiserum wurden die Antikörper der IgG-Klasse isoliert. Diese gereinigten IgG-Fraktionen wurden in der Immunpräzipitation verwendet.
Die Abbildung 18 zeigt das Proteinmuster von Chromatinproteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen nach Immunpräzipitation mit Affen-Normalserum (A),Affen-Immunserum (B) und Ziegen-IgG (C).
Im Vergleich mit dem Affenserum wird vom Ziegen-IgG eine größere Anzahl von NHCP aus der SV40-Chromatinprobe präzipitiert. Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, haben die Proteine Molekulargewichte von 97K, 88K, 86K (T-Antigen), 76K, 70K, 66K, 62K, 53K, 48K (VP1), 46K, 45K, 44K (VP2), 42K, 40K, 38K, 32K (VP3), 30K und 29K. Von den Chromatinproteinen der scheininfizierten Zellen konnten mit den gleichen Antikörpern die folgenden Proteine gebunden werden : 97K, 70K, 58K, 53K, 52K, 48K, 46K und 22K (nicht dargestellt). Das Affenserum konnte nur zwei der Proteine des Kontroll-Chromatins präzipitieren, die als schwache Banden bei 48K und 46K zu erkennen sind. Daher muß angenommen werden, daß die Ziege neben den SV40-Virionen auch eine Anzahl zellulärer Proteine injiziert bekam, gegen die ebenfalls Antikörper induziert wurden.
Als zelluläre, virusinduzierte Proteinspezies kommen nach Auswertung dieser Befunde folgende Polypeptide in Betracht: 88K, 76K, 66K, 62K, 45K, 42K, 40K, 38K, 30K und 29K.
Die Virusstrukturproteine VP1 (48K), VP2 (44K) und VP3 (32K) werden mit besonders hohen Konzentrationen am Chromatin der infizierten Zellen durch Präzipitation mit dem Ziegen-IgG nachgewiesen.

Die Antikörper von der Ziege komplexieren aus den SV40-Chromatinproben das T-Antigen, nicht jedoch das

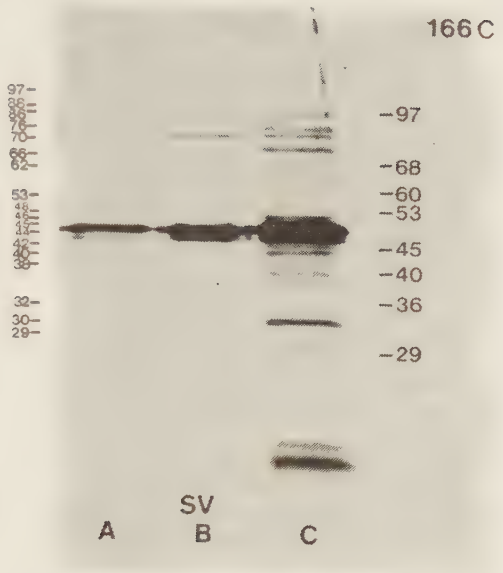


Abb. 18

Fluorogramm des Chromatin-Proteinmusters von SV40-infizierten CV-1 Zellen, 24h p.i., nach Immunpräzipitation mit Normal- und Immunseren vom Affen und mit der IgG-Fraktion des Ziegenimmunserums

SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden direkt vor Aufarbeitung 2 Stunden mit 300 µCi ^{35}S-Methionin pro 5x10^6 Zellen radioaktiv markiert. Das ultrabeschallte Chromatin von jeweils 5x10^6 Zellen wurde mit Affennormalserum voradsorbiert und danach mit den unten angebenen Immunseren präzipitiert. Die Auftrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte in der SDS-PAGE.

A : SV40-Chromatin / Affennormalserum
B : SV40-Chromatin / Affenimmunserum gegen SV40-infizierte autologe Nierenzellen
C : SV40-Chromatin / IgG-Fraktion des Ziegenserums gegen SV40-Virionen

t-Antigen (Abb. 18 vergl. Spalte B und C).
Das gleiche Ergebnis erhält man nach Präzipitation der Probe mit Affenserum (Abb. 18 Spalte B) und Hamsterserum (Abb. 15).

Zum Nachweis von Virusstrukturproteinen im Zytosol nach SV40-Infektion wurden die Zellen für zwei Stunden (22-24h p.i.) mit ^{35}S-Methionin markiert. Nach Gewinnung der Zytosolproben wurde die Immunpräzipitation mit dem Affenserum und Ziegen-IgG durchgeführt. In Abbildung 19 ist das Muster der präzipitierten Proteine dargestellt.
Von den Virusstrukturproteinen läßt sich nur VP1 nachweisen, das durch die Langzeitmarkierung (2 Stunden) in angereicherter Form im Zytosol darzustellen ist. Proteine mit den Molekulargewichten 46K, 42K, 40K, 38K, und 37K werden als stark markierte Banden nach Präzipitation mit dem Ziegen-IgG nachgewiesen. Die T-Antigenspezies (86K und 19K) sind mit den Antikörpern von der Ziege nicht im Zytosol der SV40-infizierten Zelle nachweisbar. Dieser Befund ist überraschend, da die Antikörper in der Lage sind das Chromatin-gebundene T-Antigen zu erkennen. Die Präzipitation mit dem Affenserum (Abb. 19, Spalte B'), das sowohl T-Antigen (86K) als auch t-Antigen (19K) aus dem SV40-Zytosol präzipitieren kann, beweist, daß T-Antigen in dieser Zytosolpräparation vorliegt. Aus diesem Befund läßt sich schließen, daß T-Antigen, das bei einer Viruspräparation gemeinsam mit den SV40-Virionen der Ziege injiziert wurde, zwar gemeinsame Determinanten mit dem chromosomalen T-Antigen hat, sich von der Zytosolform jedoch unterscheidet. Das Affenserum, welches Antikörper gegen Proteine aus SV40-infizierten Zellen enthält, kann sowohl das zytoplasmatische, wie auch das Chromatin-gebundene T-Antigen präzipitieren. Dieses Serum enthält auch Antikörper gegen t-Antigen, das bei diesen Untersuchungen nur im Zytosol der infizierten Zellen nachzuweisen ist. Da das Ziegen-IgG kein t-Antigen

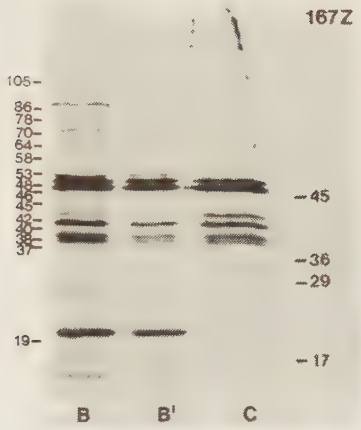


Abb. 19

Fluorogramm des Proteinmusters aus SV40-Zytosol, 24h p.i., nach Immunpräzipitation mit Affenserum und Ziegen-IgG, dargestellt in der SDS-PAGE

Die Versuchsbedingungen sind der Legende zu Abb. 18 zu entnehmen. Die Zytosolproben von $5x10^6$ SV40-infizierten CV-1 Zellen wurden mit gleicher Proteinkonzentration wie die Chromatinproben (vergl. Abb. 18) zur Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern eingesetzt.

B : Antiserum vom Affen gegen SV40-infizierte autologe Nierenzellen

B': Antiserum vom Affen gegen SV40-infizierte autologe Nierenzellen, voradsorbiert auf CV-1 Zellen

C : IgG-Fraktion des Ziegenserums gegen SV40-Virionen

aus dem Zytosol erkennt, muß angenommen werden, daß man bei der Isolierung der SV40-Partikel zwar T-Antigen und eine Reihe von zellulären Proteinen erhalten hat, gegen die in der Ziege Antikörper induziert wurden, das t-Antigen jedoch nicht in der Virusfraktion sedimentiert ist.
Durch die beschriebenen Untersuchungen konnte festgestellt werden:

1. T-Antigen und Virusstrukturproteine sind am Chromatin lokalisiert
2. t-Antigen wird nur im Zytosol nachgewiesen
3. T-Antigen wird aus dem Zytosol bereits neun Stunden und t-Antigen zwölf Stunden nach Infektion nachgewiesen
4. Die Ziegen-IgG-Fraktion und das Affenserum enthalten Antikörper gegen unterschiedliche Determinanten des T-Antigens
5. In der Ziege wurden keine Antikörper gegen t-Antigen induziert

2.2. Kinetik der viruscodierten Proteine

Parallel zu den unter III.2.1 dargestellten Untersuchungen über das Auftreten von T-Antigen im Zytosol wurde eine entsprechende Kinetik auch für das Erscheinen des T-Antigens und der Virusstrukturproteine am Chromatin durchgeführt.
Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden für 10 Minuten mit ^{35}S-Methionin markiert ('pulse') und anschließend für 30 Minuten in einem Medium mit einem Überschuß an nicht markiertem Methionin gehalten ('chase'). Die Zellaufarbeitung wurde zu den Zeitpunkten 6, 12, 15, 18 und 24 Stunden nach Infektion durchgeführt. Zum Nachweis der T-Antigenspezies wurden Chromatin- und Zytosolproben mit Affenserum immunpräzipitiert. Die Virusstrukturproteine konnten aus den gleichen Proben mit Hilfe des Ziegenserums gewon-

nen werden. Da VP2 und VP3 nach 10 Minuten 'pulse'-Markierung nur als schwache Banden darstellbar waren, wird hier stellvertretend für die Virusstrukturproteine die Kinetik des VP1 im Vordergrund der Betrachtung stehen.
In Tabelle 3 ist das Auftreten der verschiedenen viruscodierten Proteinspezies am Chromatin und im Zytosol zusammengefaßt.
Sowohl der Affe wie auch die Ziege haben nach Immunisierung Antikörper gegen T-Antigen entwickelt. Am Chromatin der infizierten Zelle ist das T-Antigen mit dem Affenserum bereits 15 Stunden nach Infektion nachzuweisen, während es vom Ziegenserum erst 24 Stunden nach Infektion erkannt wird. Aus dem Zytosol wird T-Antigen nur vom Affenserum präzipitiert und zwar schon 9 Stunden nach Infektion.
Das unterschiedliche Verhalten des Affen- und des Ziegenserums in der Immunpräzipitation kann mehrere Gründe haben:

1. Der Ziege wurden bei der Immunisierung geringere Mengen T-Antigen verabreicht als dem Affen, so daß der Antikörpertiter im Ziegenserum niedriger ist als im Affenserum
2. Das Ziegenserum und das Affenserum erkennen unterschiedliche T-Antigenspezies, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion am Chromatin auftreten (siehe Tabelle 3), jedoch gleiches Molekulargewicht aufweisen.

t-Antigen wird nur aus dem SV40-Zytosol vom Affenserum präzipitiert. 12h p.i. ist der früheste Zeitpunkt, zu dem dieses Protein erfaßt wird.
VP1 ist am Chromatin mit dem Affenserum (18h p.i.) später nachzuweisen als mit dem Ziegenserum (15h p.i.). Im Zytosol scheint das VP1 erst 18 Stunden nach Infektion in präzipitierbarer Form vorzuliegen.
Ziegen und Affenserum zeigten im Neutralisationstest Antikörper gegen SV40 (siehe III.1). Wenn VP1 das im Neutralisationstest reagierende Antigen ist, hat das

			6h	9h	12h	15h	18h	24h
T-Ag	Chromatin	A	–	–	–	+	+	+ +
		Z	–	–	–	–	–	+
	Zytosol	A	–	+	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
		Z	–	–	–	–	–	–
t-Ag	Chromatin	A	–	–	–	–	–	–
		Z	–	–	–	–	–	–
	Zytosol	A	–	–	+	+ +	+ +	+ +
		Z	–	–	–	–	–	–
VP1	Chromatin	A	–	–	–	–	+	+ +
		Z	–	–	–	+	+ +	+ + +
	Zytosol	A	–	–	–	–	+	+
		Z	–	–	–	–	+	+ +

Tabelle 3

Übersicht über das zeitliche Erscheinen der viruscodierten Proteine nach Virusinfektion in der Zelle, nachgewiesen durch Immunpräzipitation
A = Immunserum gegen SV40-infizierte Zellen vom Affen
Z = Immunserum gegen Viruspartikel von der Ziege (IgG-Fraktion)

Ziegenserum einen höheren Antikörpertiter gegen das Virusstrukturprotein als das Affenserum. Hierin liegt möglicherweise der Grund für den früheren Nachweis von VP1 am Chromatin der infizierten Zelle durch das Ziegen-IgG.

3. Immunpräzipitation von viruscodierten und virusinduzierten Nicht-Histon-Chromatinproteinen aus SV40-infizierten CV-1 Zellen mit Antikörpern vom Kaninchen

Bei den Untersuchungen zu den viruscodierten Proteinen aus SV40-infizierten Zellen konnte gezeigt werden, daß neben den viralen Proteinen, den T-Antigenspezies und den Virusstrukturproteinen, mit den verschiedenen Antiseren gleichzeitig auch zelluläre Proteine zu präzipitieren waren, deren Synthese SV40-spezifisch induziert erscheint. Um solche Proteine in Abhängigkeit vom Zeitraum nach SV40-Infektion erfassen zu können und dabei ihre Verteilung in der Zelle zu untersuchen, wurden Immunseren gegen Chromatinproteine aus unterschiedlich vorbehandelten Zellen im Kaninchen hergestellt. Dabei wurden folgende Chromatinproben als Antigen verwendet:

1. Chromatin aus scheininfizierten CV-1 Zellen, 24h p.i.
2. Chromatin aus SV40-infizierten CV-1 Zellen, 24h und 48h p.i.
3. Chromatin aus NKS-stimulierten CV-1 Zellen, 24h p.i.
4. Chromatin aus SV40-transformierten AGMK-EVa Zellen

Die Antiseren gegen SV40-Chromatin sollten Antikörper gegen virusspezifisch induzierte oder - veränderte NHCP enthalten. Diese Proteine müßten daher nach Immunpräzipitation und Auftrennung in der SDS-PAGE zu erfassen sein.
Antiseren gegen Chromatin aus scheininfizierten und

NKS-stimulierten CV-1 Zellen dienen zum Nachweis unspezifisch stimulierter NHCP. Diese Antiseren präzipitieren Proteine, die entweder ständig in der Zelle synthetisiert werden, oder deren Synthese durch Zellysat oder NKS unspezifisch stimuliert wird. Präzipitiert man mit diesen Seren die gleichen Proteine wie mit den Anti-SV40-Chromatinseren, so können diese Polypeptide nicht virusspezifisch induziert sein.
Auch aus SV40-transformierten AGMK-EVa Zellen wurde Chromatin isoliert, um damit Antikörper im Kaninchen zu induzieren. Durch dieses Antiserum sollte geklärt werden, ob es am SV40-Chromatin Proteine gibt, die auch am Chromatin aus transformierten Zellen vorhanden sind.

3.1. Kinetik der chromosomalen Proteine, dargestellt durch Immunpräzipitation mit Antiserum gegen SV40-Chromatin

Zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h, 18h, 24h und 48h p.i. wurden aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen nach 'pulse-chase'-Markierung das Chromatin gewonnen und die chromosomalen Proteine, nach Extraktion von der DNS und Voradsorption mit Kaninchen-Normalserum (zur Reduktion unspezifischer Präzipitation), mit einem Antiserum gegen Chromatin aus SV40-infizierten Zellen (Anti 48h SV40-Chromatinserum) immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt.
In der schematisierten Abbildung 20 sind nebeneinander jeweils die präzipitierten Chromatinproteine aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion dargestellt. Zu den frühen Zeitpunkten nach Infektion (0h, 6h p.i.) sind vom Kontroll- und SV40-Chromatin nur drei Proteine mit den Molekulargewichten 150K, 50K und 46K nachzuweisen.
12 Stunden nach Infektion treten erstmals SV40-spezifisch induzierte Proteine auf. T-Antigen (86K) und ein 48K Protein können zu diesem Zeitpunkt vom

Abb.20:Schematisierte Darstellung der Auftrennung von Chromatinproteinen aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, 0h bis 48h p.i. nach Immunpräzipitation mit Antiserum gegen SV40-Chromatin, 48h p.i. vom Kaninchen, in der SDS-PAGE
Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden vor Aufarbeitung mit 170 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen für 15 Minuten markiert ('pulse'), anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit Medium mit einem Zusatz von nicht markiertem Methionin inkubiert ('chase'). Die Chromatinaufarbeitung erfolgte zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h, 18h, 24h und 48h p.i.. Die extrahierten Chromatinproteine wurden mit Kaninchennormalserum voradsorbiert, bevor sie mit Anti-SV40-Chromatinserum, 48h p.i. immunpräzipitiert wurden.
K: Kontroll-Chromatin; SV: SV40-Chromatin; 0h, 6h, usw.: Aufarbeitungszeitpunkt nach Infektion

SV40-Chromatin präzipitiert werden. 18 Stunden nach Infektion treten ein 88K Protein (die gepunktete Darstellung in Abb. 20 besagt, daß es sich dabei um eine Bande mit diffuser Auftrennung handelt), sowie Proteine mit den Molekulargewichten 76K, 62K, 42K, 40K, 38K und 33K neu am Chromatin auf. Die Proteine mit den Molekulargewichten 86K (T-Antigen) und 48K lassen sich 18 Stunden nach Infektion gegenüber den früheren Zeitpunkten verstärkt darstellten.
24h p.i.werden erstmals auch vom Kontroll-Chromatin mehr Proteine präzipitiert. Ihre Molekulargewichte liegen bei 100/97K, 75K, 72K, 50K, 46K, 34K, 29K, 27K, 25K, 24K, 22,5K, 20,5K und 19K. Diese Proteine sollten, da das Anti-SV40-Chromatinserum sie erkennt, auch in der SV40-infizierten Zelle am Chromatin lokalisiert sein. Dies trifft mit Ausnahme des 75K Proteins auf alle diese Proteine zu. Es besteht allerdings die Wahrscheinlichkeit, daß das 75K Protein durch das 76K Protein, welches 24h p.i. besonders stark am Chromatin der SV40-infizierten Zelle vorliegt, überdeckt wird.
Zusätzlich zu den zellulären Proteinspezies konnten folgende Proteine aus der SV40-Chromatinprobe präzipitiert werden: 120K, 115K, 105K, 88K, 86K, 76K (stark angereichert), 70K, 62K (stark angereichert), 48K (stark angereichert), 44K, 42K, 40K, 38K, 33K, 32K, 29K und 28K.

48h p.i. werden vom SV40-Chromatin, mit Ausnahme der 72K, 70K, 44K, 28K, 27K, 24K und 19K Proteine, die gleichen Polypeptide präzipitiert wie 24h p.i.. Neu hinzu kommt ein 84K Protein, das zu früheren Zeitpunkten nocht nicht nachgewiesen werden konnte. Viele der SV40-spezifischen Proteine werden jedoch in geringerer Menge dargestellt als 24h p.i.
Aus der Kontroll-Chromatinprobe sind 48h p.i. einige Proteinspezies (75K, 72K, 27K, 25K und 24K) nicht mehr präzipitierbar. Dies weist darauf hin, daß in der Zelle neben den virusgesteuerten Prozessen nach

SV40-Infektion auch Zellzyklus bedingte, bzw. Zellysat-induzierte Veränderungen vor sich gehen, durch die die Chromatin-assoziierten Proteine der scheininfizierten Zellen betroffen werden. Im Falle des 27K und des 24K Proteins tritt diese Reduktion bei Proteinen des Kontroll- und SV40-Chromatins gleichermaßen auf.

Im Zytosol der infizierten Zellen sind mit dem Anti-SV40-Serum 48h p.i. ebenfalls Proteine zu präzipitieren. Einige dieser Proteine haben die gleichen Molekulargewichte wie sie auch am Chromatin 24h und 48h p.i. nachgewiesene Polypeptide haben (97K, 86K, 70K, 48K, 40K, 38K, 34K, 33K und 29K). Es muß angenommen werden, daß diese Proteine teilweise von der DNS abgelöst worden sind. Das T-Antigen (86K) kann auch mit dem Kaninchen Anti-48h-SV40-Chromatinserum aus dem SV40-Zytosol präzipitiert werden; es erscheint 12 Stunden nach Infektion.

Zusammenfassend kann man aus dieser Untersuchung folgende Schlüsse ziehen: Das Anti-48h-SV40-Chromatinserum kann aus SV40-infizierten CV-1 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion folgende zelluläre, SV40-induzierte oder stimulierte Proteine erfassen: 120K, 115K, 105K, 88K, 84K, 76K, 70K, 62K, 42K, 40K, 38K, 33K, 28K, 27K und 21,5K. Die meisten dieser Proteine werden 24h p.i. präzipitiert. 48 Stunden nach Infektion werden einige der Proteine nicht mehr oder nur mit verminderter Konzentration am Chromatin nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt werden jedoch mit dem Anti-Chromatinserum eine größere Anzahl von Proteinen mit dem gleichen Molekulargewicht im Zytosol der SV40-infizierten Zellen dargestellt. Als spätes, SV40-induziertes, zelluläres Protein kann man das 84K Protein bezeichnen, das erst 48h p.i. am Chromatin nachzuweisen ist. Das T-Antigen ist schon 12h p.i. vom Chromatin und aus dem Zytosol zu präzipitieren (siehe III.2.2)

Ob das 48K Protein, welches 24h p.i. verstärkt im Zytosol und am Chromatin der SV40-infizierten Zelle vorliegt, mit VP1 identisch ist, wird die Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese klären (siehe III.3.2.) VP2 (44K) ist nur 24h p.i. am Chromatin nachzuweisen. VP3 (32K) findet man 24h und 48h nach Infektion am Chromatin und 48h p.i. auch im Zytosol. VP2 muß auch 48h p.i. noch am Chromatin assoziiert sein, da das Anti 48h SV40-Chromatinserum Antikörper gegen dieses Protein aufweist. Das VP2 liegt als markiertes Protein am SV40-Chromatin wahrscheinlich in zu geringen Mengen vor, so daß es in der Fluorographie nicht erfaßt werden konnte.

3.2. Zweidimensionale Auftrennung von Chromatinproteinen, 24h p.i., immunpräzipitiert mit Antiserum gegen SV40-Chromatin, 48h p.i.

Bei der Auftrennung in der SDS-PAGE ließ sich nach Immunpräzipitation der chromosomalen Proteine aus infizierten Zellen ein stark markierter Proteinkomplex (48K-46K) nachweisen. Eine genauere Analyse dieses Proteinmusters sollte in der zweidimensionalen Gelelektrophorese, nach zweistündiger Markierung der Zellen, erfolgen. Die Abbildung 21 zeigt das Proteinmuster der präzipitierten NHCP. Es lassen sich nicht alle Proteinklassen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese darstellen, die in der eindimensionalen Auftrennung nachzuweisen waren. Einerseits werden in der zweidimensionalen Darstellung nur Proteine mit hohem Gehalt an radioaktivem Methionin erfaßt, andererseits gibt es Proteine, wie z.B. das T-Antigen, die sich im PAGIF-Probenpuffer schlecht lösen und sich deshalb nicht darstellen lassen.
In Abb. 21 fällt wiederum sofort der stark markierte Proteinkomplex bei 48K-46K auf. Nun wird deutlich, daß es sich dabei nicht allein um VP1 handelt, dessen IEP zwischen 6,7 und 6,9 anzusetzen ist (O'Farrell und

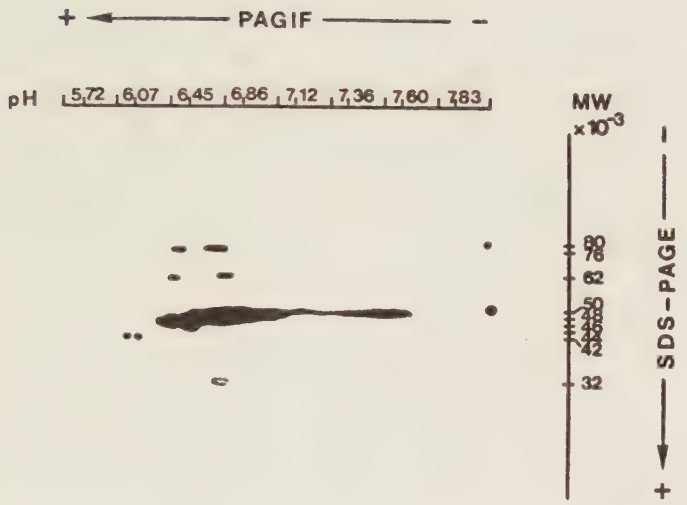


Abb. 21

Schematisierte Darstellung der zweidimensionalen Auftrennung eines Immunpräzipitats von SV40-Chromatinproteinen, 24h p.i., präzipitiert mit Antiserum gegen SV40-Chromatin, 48h p.i. vom Kaninchen
SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden 22-24h p.i. mit 250 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert, das Chromatin wurde isoliert und die NHCP durch Extraktion von der DNS gewonnen. Nach Voradsorption mit Kaninchennormalserum wurden die Chromatinproteine mit Antiserum gegen chromosomale Proteine aus SV40-infizierten CV-1 Zellen, 48h p.i. immunpräzipitiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit 1% SDS-0,02M DTT unter Erhitzen auf 60°C von den Staphylococcen abgelöst. Danach wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese, wie beschrieben, durchgeführt.
Die Zahlen am rechten Bildrand geben das relative Molekulargewicht der dargestellten Proteine an.

Goodman, 1976). Auch im Bereich von pH 7,12-7,60 wird ein (oder mehrere) Protein aufgetrennt, dessen Molekulargewicht mit 48K bestimmt wurde. Dieses Protein muß zellulären Ursprungs sein und wird virusspezifisch stimuliert.

Bei Immunpräzipitation der gleichen SV40-Chromatinprobe mit Antiserum gegen SV40-Chromatin, Oh p.i., erscheint in der zweidimensionalen Gelelektrophorese deutlich der VP1-Komplex bei 48K, da das Anti Oh SV40-Chromatinserum Antikörper gegen VP1 enthält. Das zelluläre 48K-Protein, das zwischen pH 7,12 und 7,60 fokussiert, ist jedoch nur sehr schwach nachzuweisen. Auch das 46K-Protein bei pH 6,09, das vermutlich Aktin darstellt, wird mit dem Anti Oh Serum schwächer präzipitiert (nicht dargestellt). Weiterhin wurden durch das Anti 48h Serum die Proteine mit den Molekulargewichten 76K, 62K, 42K, und 32K gebunden. Hierbei zeigte sich, daß die 76K, 62K und42K Proteine jeweils in zwei 'Flecken' mit unterschiedlichem IEP dargestellt sind.Diese Auftrennung kann zwei Ursachen haben:

1. Es gibt zwei Proteinspezies mit gleichem Molekulargewicht,aber unterschiedlichem IEP

oder

2. Es sind gleiche Proteine, die in der Zelle in unterschiedlich modifizierten Formen vorliegen

Bei dem Protein mit 32K handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um das VP3-Molekül, welches 24h p.i. am Chromatin nach zweistündiger Markierung verstärkt nachzuweisen ist (vergl. Abb. 18).

3.3. Immunpräzipitation von chromosomalen Proteinen mit Antiserum gegen Chromatin aus SV40-transformierten AGMK-EVa Zellen

Im Anschluß an die Untersuchungen zu den SV40-induzierten Proteinen am Chromatin der lytisch infizierten CV-1 Zellen mit Antiseren gegen NHCP aus SV40-infizierten CV-1 Zellen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion,

sollte nun überprüft werden, ob es möglich ist, gleiche Proteine auch mit Antiserum gegen NHCP aus SV40-transformierten Affennierenzellen (AGMK-EVa) zu präzipitieren.

Die Abbildungen 22a-e zeigen das Proteinmuster der lytisch infizierten Zelle, nach Immunpräzipitation mit Anti AGMK-EVa-Chromatinserum (Anti AGMK-EVa-Seren) in der SDS-Page.
Wie die Abb.22a (Spalte 1 und 2) zeigt, sind mit diesem Antiserum vom Chromatin Oh p.i. folgende Proteine präzipitierbar: 175K, 100/97K (Doppelbande), 75K, 72K, 50K und 46K. Beim Vergleich dieser Präzipitate mit der Abb. 20, in der die Immunpräzipitate von Chromatinproben Oh-48h mit Anti 48h SV40-Chromatin Serum dargestellt sind, zeigt sich, daß ein 75K und ein 72K Protein aus den Chromatinextrakten Oh p.i. mit dem Anti AGMK-EVa-Serum zusätzlich präzipitiert werden kann.
6h p.i. verstärkt sich das Bandenmuster (Abb. 22b) der präzipitierten Chromatinproteine. Die hochmolekularen 135K, 120K, 115K und 82K Proteine werden neu erfaßt. Im niedermolekularen Bereich erscheint ein 28K Protein. Das 72K Protein wird verstärkt präzipitiert.
Zum Zeitpunkt Oh und 6h p.i. sind noch keine SV40-spezifischen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Kontroll- und SV40-Chromatinproben zu erfassen.
12h p.i. kann vom SV40-Chromatin mit dem AGMK-EVa-Serum (Abb. 22c, Spalte 2) das T-Antigen präzipitiert werden, gleichzeitig erscheint eine 76/75K Doppelbande.
Die stärksten Veränderungen in der Zusammensetzung der Chromatinproben erfaßt man 18h p.i.. Hier treten die hochmolekularen Proteinspezies, einschließlich des 100/97K Komplexes besonders deutlich hervor (Abb. 22d, Spalte 1 und 2). Im hochmolekularen Bereich (97K) werden jedoch nur Chromatinproteine, die sowohl in schein- wie in SV40-infizierten Zellen gleichermaßen vorhanden sind, präzipitiert.
18h p.i. wird das T-Antigen besonders stark vom Anti AGMK-EVa-Serum nachgewiesen. Hinzu kommt noch ein 88K Protein, das vom Chromatin und aus dem Zytosol der SV40-

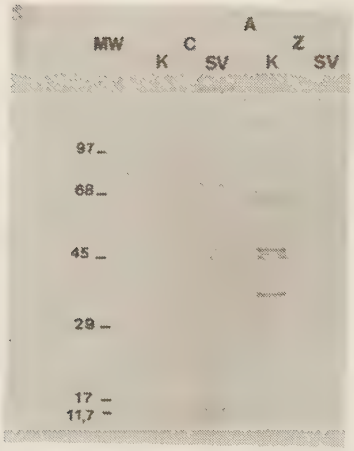


Abb.22a

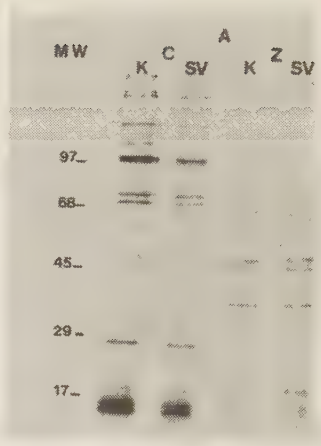


Abb.22b

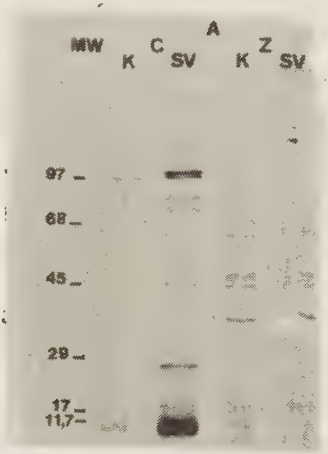


Abb.22c

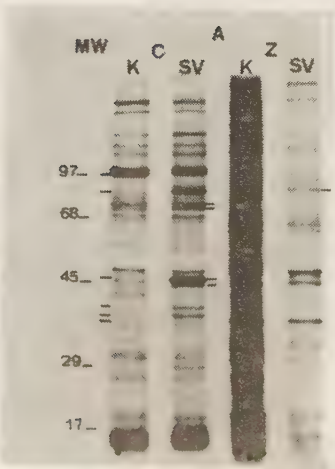


Abb.22d

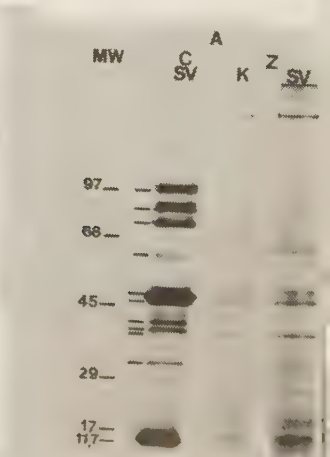


Abb.22e

infizierten Zelle präzipitiert wird (Abb. 22d, Spalte 2 und 4). Zu dieser Zeit nach Infektion werden auch Proteine mit den Molekulargewichten 40K, 38K und 29K vom Chromatin der SV40-infizierten Zellen stark präzipitiert.

24h p.i. (Abb. 22e) können vor allem die Proteine mit den Molekulargewichten 100/97K, 88K, 86K, 76K, 62K, 48K, 46K, 40K, 38K und 32K aus der SV40-Chromatinprobe präzipitiert werden. 48K und 32K können die Virusstrukturproteine VP1 und VP3 sein, die unspezifisch an die Staphylokokkenoberfläche binden (siehe III.2.1.)
Das t-Antigen konnte zu keinem der hier untersuchten Zeitpunkte nach Infektion mit dem AGMK-EVa-Serum nachgewiesen werden. T-Antigen (86K) wurde nur am Chromatin der SV40-infizierten Zelle präzipitiert. Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Zytosolproben von schein- und SV40-infizierten Zellen konnten, abgesehen von dem 88K Protein, 18h p.i. im SV40-Zytosol (Abb. 22d, Spalte 4), nicht nachgewiesen werden.
Im wesentlichen werden mit dem Antiserum gegen AGMK-EVa-Chromatin gleiche Proteinspezies präzipitiert wie mit dem Anti 48h Chromatinserum (siehe Abb. 20).

Legende zur Abb. 22a-e

Fluorogramm des Proteinmusters aus ^{35}S-Methionin-markierten schein- und SV-40-infizierten CV-1 Zellen, nach Immunpräzipitation mit Antiseren gegen AGMK-EVa-Chromatin vom Kaninchen und Auftrennung in der SDS-PAGE

CV-1 Zellen wurden nach schein- und SV40-Infektion mit 170 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen 'pulse-chase'-markiert. Die Aufarbeitungen erfolgten 0h, 6h, 12h, 18h und 24h p.i.. Zur Immunpräzipitation wurden die Proteine von der DNS extrahiert und mit Kaninchennormalserum absorbiert. Anschließend wurden die Proben mit Anti AGMK-EVa-Chromatinseren inkubiert und die Immunpräzipitation, wie beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der Proteine erfolgte in der SDS-PAGE.
A: Antiserum gegen Chromatinproteine aus AGMK-EVa Zellen
C: Chromatin; Z: Zytosol;
SV: SV40-infiziert; K: scheininfiziert
Abb. 22a : Zellaufarbeitung 0h p.i.
Abb. 22b : Zellaufarbeitung 6h p.i.
Abb. 22c : Zellaufarbeitung 12h p.i.
Abb. 22d : Zellaufarbeitung 18h p.i.
Abb. 22e : Zellaufarbeitung 24h p.i.

Man kann daraus schließen, daß am Chromatin der transformierten Zelle ähnliche Proteine immunogen wirken wie am Chromatin der lytisch infizierten Zelle. Bei einigen präzipitierten Proteinen konnten jedoch Besonderheiten festgestellt werden:
Schon 6 Stunden nach Infektion werden vom Kontroll- und vom SV40-Chromatin Proteine mit den Molekulargewichten 100K, 97K, 75K und 72K mit dem Anti AGMK-EVa-Chromatinserum präzipitiert. Diese Proteine erkennt das Anti 48h SV40-Chromatinserum erst 24 Stunden nach Infektion. Es muß angenommen werden, daß in beiden Seren Antikörper gegen unterschiedliche Determinanten dieser Proteine vorliegen. Wie die Untersuchungen in Abschnitt II.3.2 gezeigt haben, können gerade Proteine mit diesem Molekulargewicht unspezifisch durch Zellysat stimuliert werden (siehe Abb. 11a). Es wäre denkbar, daß die Proteinspezies nach Stimulation modifiziert worden sind und im Anti 48h Chromatinserum Antikörper gegen diese modifizierten Determinanten vorhanden sind, während am AGMK-EVa-Chromatin die nicht stimulierten Proteinspezies vorgelegen haben, gegen die im Kaninchen Antikörper induziert wurden. Hiermit wäre zu erklären, warum das Anti AGMK-EVa-Serum diese Proteine zu früheren Zeitpunkten nach Infektion präzipitieren kann.

T-Antigen konnte nur vom Chromatin in der infizierten CV-1 Zelle durch das Anti AGMK-EVa-Chromatinserum präzipitiert werden. Während Kaninchenseren gegen Chromatin aus SV40-infizierten CV-1 Zellen auch die zytoplasmatische Form des T-Antigens und des t-Antigens erkennen, werden diese Proteine mit dem Anti AGMK-EVa-Serum nicht immunpräzipitiert. Hieraus kann man schließen, daß am AGMK-EVa-Chromatin eine T-Antigenspezies gebunden ist, die andere antigene Determinanten besitzt als das chromosomale T-Antigen aus der lytisch infizierten Zelle. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits bei der Immunpräzipitation von Proteinen aus der SV40-infizierten Zelle mit dem Ziegenserum gegen SV40-Virionen (siehe 2.2) beobachtet werden.

3.4. Darstellung der chromosomalen Proteine nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden und Immunpräzipitation mit Anti SV40-Chromatinserum

Wie bereits in Teil II unter 3.3. dargestellt wurde, sind NHCP nicht dauerhaft an die DNS gebunden, sondern haben zumeist nur eine bestimmte Verweilzeit am Chromatin und werden, sofern sie ständig an der DNS benötigt werden, aus dem Zytosol durch Neusynthese ersetzt. Um die Verweilzeit der zellulären Proteine, die durch Kaninchen Anti-Chromatinserum präzipitiert werden können, zu überprüfen, wurden CV-1 Zellen schein- und SV40-infiziert und 24h p.i. 'pulse-chase'-markiert. Die 'chase'-Zeiten wurden im Bereich von 0 bis 90 Minuten mit einem Überschuß an nicht markiertem Methionin im Medium durchgeführt.
Nach einem 15 minütigem 'pulse' mit direkt darauffolgender Aufarbeitung ohne 'chase', kann man vom Chromatin der SV40-infizierten Zelle mit dem Anti 24h SV40-Chromatinserum bereits den größten Teil der präzipitierbaren Proteine darstellen (Abb. 23). Die Spalte 2 zeigt SV40-Chromatinproteine, die direkt nach der Synthese ans Chromatin gebunden werden. Zu diesen Proteinen gehört das T-Antigen (86K) und VP1 (48K), sowie die zellulären Proteine mit den Molekulargewichten 76K, 46K, 42K, 40K, 38K, 36K und 34K. Aus der Kontroll-Chromatinprobe präzipitiert man direkt nach Markierung ein 50K und ein 46K Protein.
Nach 15 minütigem 'chase' (Spalte 3 und 4) treten mit schwacher Konzentration zusätzlich zwei weitere Proteine auf, ein 34K und ein 32K (VP3) Protein. Die anderen Proteine zeigen gleiche Bandenstärke wie nach 15 minütiger 'pulse'-Markierung. Nach 30 Minuten 'chase' erscheint das 62K Protein am Chromatin der virusinfizierten Zelle (Spalte 6). Dieses Protein hat nur eine kurze Verweilzeit am Chromatin, nach 45 Minuten 'chase' ist es bereits nicht mehr nachweisbar. Die NHCP mit

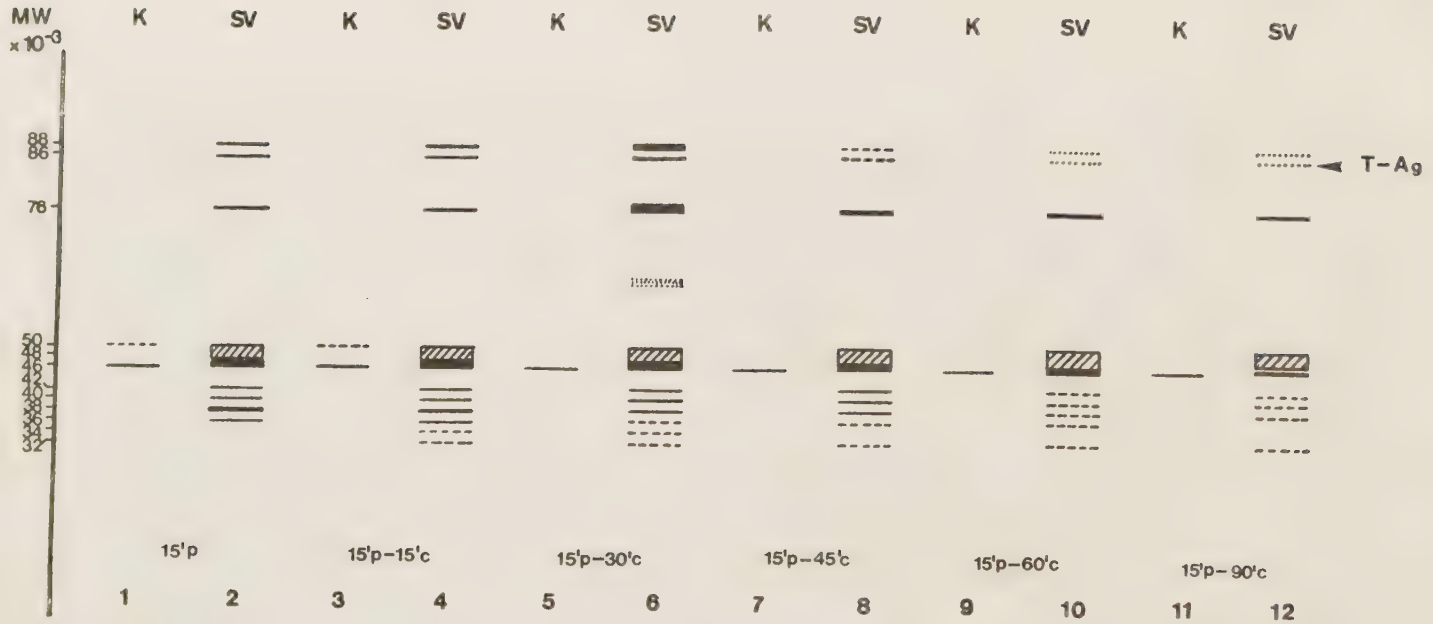


Abb.23:Schematisierte Darstellung von Chromatinproteinen aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, 24h p.i., nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Zeiten und Immunpräzipitation mit Antiserum gegen SV40-Chromatin vom Kaninchen
Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden 24h p.i. mit 100 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen markiert. Ein Teil der Zellen wurde sofort aufgearbeitet, die anderen Zellen wurden für 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten mit Medium, das mit unmarkiertem Methionin angereichert war, inkubiert ('chase'). Im Anschluß an diese 'chase'-Perioden wurden auch diese Zellen,wie unter Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet.
Die Chromatinproteine wurden von der DNS extrahiert und mit Kaninchennormalserum adsorbiert. Daran anschließend wurde die Immunpräzipitation mit Antiserum vom Kaninchen gegen SV40-Chromatin, 24h p.i., durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt
15'p : 15 minütige Markierungszeit (p); 15'-90'c : 15 bis 90 minütige 'chase'-Periode (c);
K: Kontroll-Chromatin; SV: SV40-Chromatin

den Molekulargewichten 88K und 76K werden in den 30 Minuten des 'chase' am Chromatin angereichert, sie können zu diesem Zeitpunkt mit größter Intensität am Chromatin nachgewiesen werden. Die Konzentration des T-Antigens bleibt bis 45 Minuten nach Markierung konstant. Zu diesem Zeitpunkt (s. Spalte 8) nimmt die Konzentration von 88K und 86K (T-Antigen) rapide ab, das 76K Protein ist in seiner Konzentration ebenfalls vermindert, nur die Konzentration des 48K-46K-Komplexes nimmt an Umfang bis zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Markierung noch zu.
Das 34K Protein ist nach 45 Minuten 'chase' nicht mehr am Chromatin nachzuweisen.
90 Minuten nach Markierung liegen 88K und 86K (T-Antigen) Protein nur noch in geringen Mengen am Chromatin vor (Spalte 12). Das 76K Protein bleibt während des gesamten untersuchten Zeitraums am Chromatin assoziiert.
Die niedermolekularen Proteinspezies mit den Molekulargewichten 42K, 40K, 38K und 34K liegen nach 90 minütigem 'chase' nur noch in schwacher Konzentration vor.
Auch der 48K-46K-Komplex wird nur noch in vermindertem Umfang dargestellt.
Es hat den Anschein, als ob die NHCP bis zum 30 minütigen 'chase' am Chromatin angereichert würden. D.h. von den Molekülen eines Proteins, die während des 15 minütigen 'pulse' in der Zelle synthetisiert werden, wandern nicht alle gleichzeitig in den Kern um an das Chromatin zu binden. Im Falle des 88K oder des 76K Proteins werden diese Moleküle am Chromatin während des 30 minütigen 'chase' langsam angereichert.
Beim T-Antigen scheinen alle Moleküle direkt ans Chromatin zu binden, die Konzentration bleibt dann für 30 Minuten stabil, um danach bis zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Markierung abgelöst zu werden.
Auch das 88K Protein wird nach seiner maximalen Konzentration am Chromatin (30 Minuten 'chase') im gleichem Maße verringert wie das T-Antigen.
Der 48K-Komplex wird am längsten am Chromatin angereichert; bis zum 60 minütigen 'chase' liegt er in stabiler

Form am Chromatin vor. Erst 90 Minuten nach Markierung wurden die Proteine mit geringeren Konzentrationen dargestellt. Relativ stabil bleiben auch die Proteine mit den Molekulargewichten 42K, 40K, 38K und 34K an der DNS assoziiert, sie sind bis zur letzten 'chase'-Periode, 90 Minuten nach Markierung, noch nachweisbar.
Interessant ist der Nachweis des 62K Proteins. Hierbei handelt es sich um eine Spezies, die erst 30 Minuten nach Synthese ans Chromatin bindet, jedoch nach 45 Minuten 'chase' schon wieder abgelöst ist.
Da das Protein bei Immunpräzipitation von zwei Stunden markiertem SV40-Chromatin nachweisbar ist (vergl. Abb. 18 und 21), muß es einen hohen Umsatz in der Zelle haben und ständig durch neue Moleküle ersetzt werden.
Aus dem Zytosol der 'pulse-chase'-markierten Zellen, das gleichfalls gewonnen wurde, konnten 90 Minuten nach Markierung außer dem VP1-Molekül, keine weiteren Proteine in nennenswerten Konzentrationen präzipitiert werden. VP1 wird demnach nach Ablösung von der DNS nicht degradiert, sondern liegt im Zytosol in nachweisbarer Form vor.

3.5. Nachweis von Chromatinproteinen nach Behandlung der Zellen mit Cytosinarabinosid und Immunpräzipitation mit verschiedenen Anti Chromatinseren

Durch die folgende Untersuchung sollte festgestellt werden, welche der zellulären und viruscodierten Proteine, die durch verschiedene Antiseren vom Chromatin präzipitiert werden konnten, in ihrer Synthese durch AraC beeinflußt werden. Parallel dazu wurden die Immunpräzipitationen auch mit Chromatinproben aus Zellen ohne AraC-Behandlung durchgeführt (nicht dargestellt).
Zur Immunpräzipitation der chromosomalen Proteine aus schein- und SV40-infizierten Zellen wurden Antikörper von Kaninchen eingesetzt, die gegen NHCP unterschiedlich vorbehandelter Zellen induziert wurden.

Es handelt sich dabei um ein Serum gegen Kontroll-Chromatin 24h p.i. (Anti Kontroll-Chromatin), ein Serum gegen das Chromatin aus SV40-infizierten Zellen, 24h p.i. (Anti 24h SV40-Chromatin) und ein Antiserum gegen das Chromatin aus NKS-stimulierten Zellen (Anti NKS-Chromatin), 24h p.i.. Letztgenanntes Antiserum wurde gegen Chromatinproteine aus CV-1 Zellen hergestellt, die 2 Stunden mit einem Medium, das 20% NKS enthielt, inkubiert und 25 Stunden nach Infektion aufgearbeitet wurden.

In der Abb. 24 sind die Proteinbanden graphisch dargestellt, die nach AraC-Behandlung, 24h p.i. aus den schein- und SV40-infizierten Zellen vom Chromatin mit den oben genannten Immunseren präzipitiert werden konnten. Insgesamt erscheint das Proteinmuster nach AraC-Behandlung reduziert. Die starken Proteinbanden des SV40-Chromatins, im Bereich von 88K, 86K und 46K, sind nur noch schwach wahrzunehmen (vergl. Abb. 20). Die Proteine mit den Molekulargewichten 76K, 62K, 48K (VP1), 44K (VP2), 42K, 40K, 38K, 36K, 32K (VP3) und 21,5K fehlen vollständig.
Alle Antiseren präzipitieren vom Chromatin der schein- und SV40-infizierten Zellen einen hochmolekularen 175/170K-Komplex, die 100/97K Proteine, die Proteine bei 50/46K und im niedermolekularen Bereich ein 22,5K und ein 19K Protein.
Mit dem Anti Kontrollchromatin Serum (A) (Abb. 24) werden aus der Kontroll- und der SV40-Chromatinprobe zusätzlich die zellulären Proteine mit den Molekulargewichten 75K und 72K präzipitiert.
Das Anti NKS-Chromatin Serum (B) erkennt das 88K und das 34K Protein.
Das Anti 24h SV40-Chromatin Serum (C) präzipitiert das 88K Protein deutlich stärker als das Anti NKS-Serum; gleichfalls läßt sich das T-Antigen (86K) mit diesem Serum, jedoch in erheblich geringerer Konzentration als in der nicht mit AraC-behandelten Zelle, nachweisen.

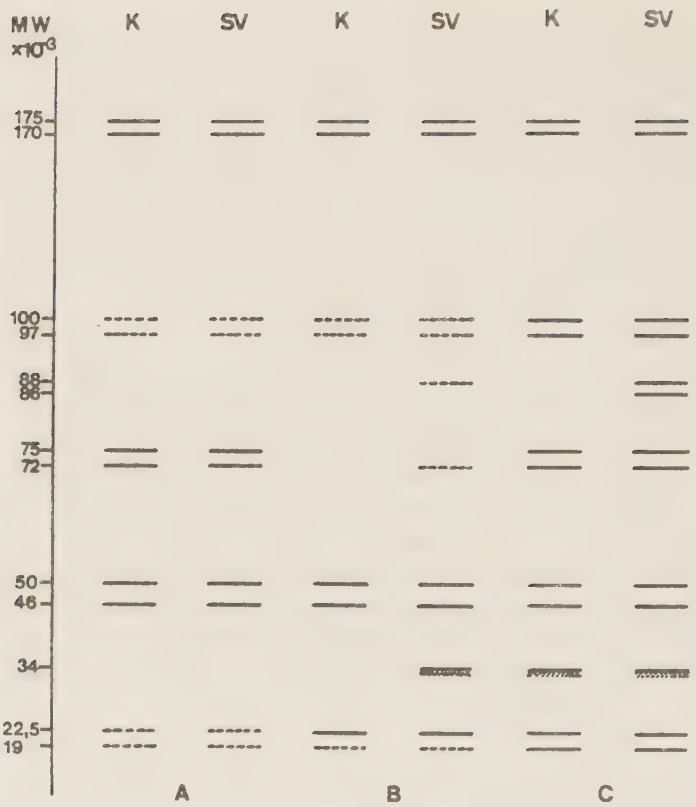


Abb.24

Schematisierte Darstellung des Proteinmusters aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, 24h p.i., nach Behandlung mit AraC und nach Immunpräzipitation mit Antiseren gegen Chromatin aus Zellysat und SV40-infizierten und Serum-stimulierten CV-1 Zellen, 24h p.i., vom Kaninchen

Schein- und SV40-infizierte CV-1 Zellen wurden von der Infektion bis zur Aufarbeitung, 24h p.i., in einem Medium mit AraC (20 µg/ml) gehalten. Direkt vor der Aufarbeitung wurden die Zellen mit 200 µCi ^{35}S-Methionin pro $5x10^6$ Zellen 'pulse-chase'-markiert. Die Proteine des Kontroll- und des SV40-Chromatins wurden durch Extraktion von der DNS abgelöst und mit Kaninchennormalserum voradsorbiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit den unten angegebenen Antiseren. Die eluierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt.

K : Kontroll-Chromatin, 24h p.i.; SV : SV40-Chromatin, 24h p.i.
A : Antiserum gegen Kontroll-Chromatin, 24h p.i.
B : Antiserum gegen NKS-Chromatin, 24h p.i.
C : Antiserum gegen SV40-Chromatin, 24h p.i.

Auch das 34K Protein wird von diesem Antiserum noch erkannt.
Interessant scheint die Präzipitation des 88K Proteins zu sein. Nach den vorangegangenen Untersuchungen hatte es den Anschein, daß dieses Protein virusinduziert sei. Der Befund, daß dieses Protein mit einem Antiserum gegen NKS-stimuliertes Chromatin nachzuweisen ist, läßt darauf schließen, daß es durch verschiedene Faktoren induzierbar ist.
Andererseits scheinen die zellulären 75K und 72K Proteine, die am Chromatin der schein- und SV40-infizierten Zelle antigen gewirkt haben, am NKS-Chromatin nicht mehr (75K) beziehungsweise vermindert (72K) vorzuliegen.

Die 76K und 62K Proteine, die mit großen Konzentrationen am SV40-Chromatin, 24h p.i. vorliegen, können nach AraC-Behandlung der Zelle nicht mehr nachgewiesen werden. Ihre Synthese ist demnach von der DNS-Replikation abhängig, oder durch das Fehlen von DNS-replikationsabhängigen Enzymen (regulative Proteine) blockiert.
Gleiches gilt für die niedermolekularen Proteinspezies 42K, 40K, 38K und 36K, die am Chromatin der SV40-infizierten Zelle 24h p.i. mit großen Konzentrationen nachgewiesen werden können.
Bei den Untersuchungen der Chromatinproteine aus AraC-behandelten CV-1 Zellen konnte bei einer Reihe von Proteinen eine Stimulierung ihrer Synthese nach AraC-Behandlung festgestellt werden (vergl. Abb. 8b); diese Proteine konnten durch Immunpräzipitation der NHCP aus Cytosinarabinosid-behandelten SV40-infizierten CV-1 Zellen nicht erfaßt werden. Dadurch ist nachgewiesen, daß diese Proteine nicht ständig am Chromatin der CV-1 Zelle vorliegen, da sie sonst durch das Anti Kontroll-Chromatin- oder das Anti 24h SV40-Chromatinserum erfaßt werden müßten.

E. D I S K U S S I O N

Durch die dargestellten Untersuchungen konnte in der SV40-infizierten CV-1 Zelle aufgrund unterschiedlicher Analysenmethoden ein reichhaltiges Muster SV40-spezifisch induzierter oder veränderter chromosomaler Nicht-Histon-Proteine ermittelt werden.
Zunächst wurde anhand verschiedener ein- und zweidimensionaler Methoden, in Abhängigkeit vom Zeitraum nach Infektion, versucht, einen Überblick über das vielfältige Auftreten virusinduzierter Proteine am Chromatin zu geben. Durch immunologische Methoden konnten einige viruscodierte und virusinduzierte Proteine näher charakterisiert werden.

I. Auswirkung der SV40-Infektion auf die Zellteilung und den Einbau von ^{35}S-Methionin in Zellproteine

Untersuchungen der Zellteilungsaktivität und des Einbaus von radioaktivem Methionin in Proteine der schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen konnten Veränderungen in der Stoffwechselaktivität der Zellen verdeutlichen und damit Hinweise auf den Zeitpunkt geben, zu dem am SV40-Chromatin mit Veränderungen der Proteinzusammensetzung zu rechnen ist.

Nach anfänglicher Reduktion der Zellzahl nach SV40-Infektion konnte ein Anstieg der Zellzahl 12 Stunden nach Infektion in Kontrollzellen um 50 % und in SV40-infizierten Zellen um 48,6 % nachgewiesen werden. Während die Kontrollzellen 24-48 Stunden nach Scheininfektion nochmals in eine Teilungsphase übergingen, konnte bei den infizierten Zellen, in Folge der virusbedingten Zelllyse, eine Verminderung der Zellzahl festgestellt werden.

Nach SV40-Infektion wird innerhalb der ersten 3 Stunden nach Infektion der Einbau an ^{35}S-Methionin in Zellproteine reduziert. Von dieser Hemmung sind sowohl die

chromosomalen NHCP als auch die Proteine des Zytosols und des Gesamtzellhomogenats betroffen. In Kontrollzellen wird eine Reduktion im Einbau der radioaktiven Aminosäure erst 3 Stunden nach Scheininfektion beobachtet. Ob es sich bei dem reduzierten Einbau um die gleiche Stoffwechselstörung handelt, die in SV40-infizierten Zellen früher auftritt als in den Kontrollzellen, oder ob es sich bei der Einbauhemmung von ^{35}S-Methionin direkt nach Infektion um einen SV40-spezifischen Prozess handelt, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.
Der reduzierte Einbau einer radioaktiven Aminosäure in Proteine des Gesamtzellhomogenats aus SV40-infizierten Zellen 0 - 3 Stunden nach Infektion wurde bereits 1972 von Rovera et al. beschrieben. Aus seiner Arbeit geht jedoch nicht der Grund für die Hemmung im Einbau von Aminosäuren, die auf eine reduzierte Proteinsynthese direkt nach Infektion schließen läßt, hervor. Es muß angenommen werden, daß dieser Effekt, der sowohl für die Proteine des Gesamtzellhomogenats als auch für NHCP und Zytosolproteine gleichermaßen in Erscheinung tritt, bisher noch nicht untersucht wurde. Anhand des Proteinmusters nach Auftrennung in der SDS-PAGE (siehe Abb. 5a) und der zweidimensionalen Gelelektrophorese (siehe Abb. 10) kann dieser reduzierte Einbau, bei gleicher Konzentration an aufgetrennten Proteinen, verdeutlicht werden. Proteine, die zu diesen Zeitpunkten am Chromatin der SV40-infizierten Zelle nachgewiesen werden, sind strukturbildende Proteine wie das Aktin und die Histone.

6 Stunden nach Infektion kann bei den Proteinen des Kontroll- und des SV40-Chromatins eine leichte Stimulierung im Einbau des radioaktiven Methionins beobachtet werden.

Eine starke, SV40-spezifische Stimulierung der NHCP kann 24-48 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden. Im Zytosol nimmt die Menge an radioaktivem ^{35}S-Methionin pro µg Protein von der 24.-48. Stunde nach Infektion ab.

Nach diesen Einbaustudien kommen zwei Zeitpunkte in Frage, die auf Veränderungen im Proteinmuster der NHCP schließen lassen: 6h p.i. und 24h p.i.
Der verstärkte Einbau an radioaktiven Aminosäuren, 6h p.i., geht der Zellteilung, die 12h p.i. sowohl bei den Kontroll- als auch bei den SV40-infizierten Zellen zu beobachten ist, voraus. Da die vermehrte Proteinsynthese gleichermaßen in Kontroll- und in SV40-infizierten Zellen bestimmt wurde, muß angenommen werden, daß dieser Effekt auf einen unspezifischen Stimulus durch Schein- und SV40-Infektion und dem damit verbundenen Mediumwechsel zurückzuführen ist. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die zu den frühen Zeitpunkten nach Infektion (0-12h p.i.) Einbaustudien an infizierten Zellen durchführten (Kiehn, 1973; Rovera et al., 1972; Iida und Oda, 1975).
Bei der Analyse des NHCP-Musters zu verschiedenen Zeiten nach Infektion in der SDS-PAGE (siehe Abb. 5a) konnte die unspezifische Stimulierung der chromosomalen Proteine 6h p.i. anhand des Proteinmusters nachgewiesen werden. Dabei konnte zwar ein deutlich verstärkter Einbau an Radioaktivität, in Form einer stärkeren Schwärzung des Films bei gleicher Proteinmenge gegenüber den Chromatinproben zum Zeitpunkt 3h oder 9h p.i., nachgewiesen werden, es konnte jedoch kein Unterschied im eindimensionalen Proteinmuster der chromosomalen Proteine aus schein- und SV40-infizierten Zellen nachgewiesen werden.

24 Stunden nach Infektion scheint jedoch ein Zeitpunkt zu sein, zu dem sich am Chromatin SV40-spezifische Veränderungen nachweisen lassen. Da zu diesem Zeitpunkt nach Infektion die virale DNS-Replikation und die Synthese der Virusstrukturproteine bereits begonnen hat (Anderson und Gesteland, 1972; Kiehn, 1973; Parker et al., 1975), wird ein großer Teil der eingebauten Radioaktivität am Chromatin in Form von viruscodierten Proteinen nachgewiesen.

Nicht nur bei den viruscodierten, auch bei den wirtszellcodierten Proteinen lassen sich zu diesem Zeitpunkt nach Infektion Veränderungen darstellen. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte festgestellt werden, daß innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion die Synthese der mRNS und der ribosomalen RNS um 30 % ansteigt (Oda und Dulbecco, 1968a; May et al., 1976). Diese Stimulierung der RNS-Synthese läßt darauf schließen, daß nach SV40-Infektion die Proteinsynthese angeregt wird. Dies konnte von Iida und Oda (1975) und Khandjian et al. (1980) bestätigt werden, die eine Stimulierung der NHCP-Synthese 24h p.i. feststellen konnten. Untersuchungen von Sambrook und Shatkin (1969) und Dulbecco et al. (1965) konnten zeigen, daß auch Enzyme der DNS-Synthese, wie die DNS-Ligase, DNS-Polymerase und Thymidinkinase mit der 24. Stunde nach Infektion stimuliert vorliegen. 11-20 Stunden nach Infektion kommt es in Abhängigkeit von der Stimulation der zellulären und viralen DNS-Replikation zur vermehrten Synthese der Histone (Winocour und Robbins, 1970; Liberti et al., 1976; Kay und Singer, 1977). Das Maximum der Histonsynthese wird gleichzeitig mit der viralen DNS-Synthese, 40 Stunden nach Infektion erreicht (Tan, 1977).

Die eigenen Untersuchungen zum Einbau von ^{35}S-Methionin in Chromatinproteine wie die verschiedenen Literaturbefunde ließen es ratsam erscheinen, zum Nachweis der virusspezifisch induzierten oder stimulierten NHCP den Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion zu wählen.

II. Nachweis SV40-spezifischer Chromatinproteine durch ein- und zweidimensionale Analysenmethoden

Zur Analyse des NHCP-Musters mit verschiedenen ein- und zweidimensionalen Methoden wurde das Chromatin nach einer Präparation von Liew und Chan (1976) gewonnen. Die DNS mit den assoziierten Proteinen wird nach Lyse der

Zellen in gepufferter Saccharoselösung, die Triton X-100 und Natriumdesoxycholat enthält, isoliert. Bei dieser Methode werden die Zellmembranen sowie die äußere und innere Kernmembran, die lamina densa und der Porenkomplex des Zellkerns aufgelöst. Das Chromatin behält seine Integrität ohne limitierende periphere Strukturen (Kirschner et al., 1977). Über mehrer Zentrifugationsschritte werden zytoplasmatische Bestandteile vom DNS-Proteinkomplex abgetrennt.
Diese Methode der Chromatingewinnung bietet die Gewähr für geringe Kontaminationen des Chromatins durch zelluläre Bestandteile (Peterson und McConkey, 1976; Man et al., 1980). Durch eigene Experimente, bei denen radioaktiv markierte Zytosolproteine mit nicht markierten 'Detergenz'-Zellkernen inkubiert und anschließend die adsorbierte Radioaktivität bestimmt wurde, konnte nachgewiesen werden, daß weniger als 4 % der in zytoplasmatische Proteine eingebauten Radioaktivität am Chromatin vorhanden war (nicht dargestellt). Durch andere Arbeitsgruppen wurde festgestellt, daß Proteine des Zytoplasmas, die bei solchen Inkubationsversuchen eine Affinität zum DNS-Proteinkomplex zeigten, keine Verunreinigungen darstellen, sondern Polypeptide sind, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert sind und eine Verbindung zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma herstellen (Goldstein et al., 1977; Clark und Merriam, 1977).

Zur Analyse des NHCP-Musters wurden die chromosomalen Proteine mit NaCl und DTT von der DNS extrahiert. Dabei konnten ca. 70 % der chromosomalen Proteine eluiert werden. Für die verbleibenden 30 % der NHCP konnte durch Analyse des Proteinmusters nachgewiesen werden, daß es sich um Proteine mit gleichem Molekulargewicht handelt, wie sie auch im Extraktionsüberstand erfaßt werden können (nicht gezeigt).
Zur Darstellung von Proteinen wurden die Zellen vor Aufarbeitung mit ^{35}S-Methionin markiert. Die direkte Anfärbung unmarkierter Proteine nach ein- und zweidimensionaler Auftrennung mit Coomassie brillant blue hat

sich als zu unsensibel erwiesen, um Proteine, die in geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen, darzustellen. Durch Einbau von markierten Aminosäuren mit hoher spezifischer Radioaktivität können auch Proteine, die nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen, markiert und bei entsprechend langer Expositionszeit durch Fluorographie erfaßt werden. Vor allem bei der Analyse von Immunpräzipitaten ist es wichtig, mit markierten Zellproteinen als Antigen zu arbeiten, da sich die Immunglobuline nach Anfärbung im Gel als starke Banden darstellen, die immunpräzipitierte Proteine überdecken könnten.
Zur Erfassung virusinduzierter NHCP wurde zunächst die Auftrennung der Proteine in der eindimensionalen SDS-PAGE durchgeführt. Durch Chromatingewinnung zu verschiedenen Zeiten nach Infektion konnten nach dieser Analysenmethode bereits 15 Stunden nach Infektion Veränderungen im Proteinmuster des SV40-Chromatins nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um ein SV40-induziertes Protein mit dem Molekulargewicht 86K.

18-24 Stunden nach Infektion konnten weitere SV40-induzierte Proteine mit den Molekulargewichten 88K, 76-72K, 48-44K, 36K und 29K am Chromatin nachgewiesen werden. Insgesamt konnte nach Auftrennung der Chromatinproben aus schein- und SV40-infizierten Zellen in der SDS-PAGE bei 8 Proteinen SV40-spezifische Veränderungen festgestellt werden.
Durch die Auftrennung von Chromatinproteinen aus schein- und SV40-infizierten CV-1 Zellen, 24 Stunden nach Infektion in der Flachbett-Fokussierung mit anschließender Analyse der Proteine in der SDS-PAGE konnten bei mehr als 20 Proteinspezies des SV40-Chromatins Veränderungen gegenüber den Polypeptiden der Kontrollprobe ermittelt werden. Dabei wurde festgestellt, daß Proteine, die sowohl am Kontroll- als auch am SV40-Chromatin erscheinen und gleiche Molekulargewichte aufweisen, sich in ihrem IEP deutlich voneinander unterscheiden können. Dies gilt für die Proteine mit den Molekulargewichten 84K,

80K, 76K, 58K, 50K, 48K, 45K, 41K, 28K, 26K und 20K. Durch die Kombination zweier analytischer Systeme, Fokussierung im granulierten Flachgel - SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, konnte eine Methode zur Erkennung virusinduzierter und virusstimulierter Proteine, die sich aufgrund ihres IEP von zellulären Proteinen unterscheiden, jedoch das gleiche Molekulargewicht aufweisen, eingeführt werden.

Zur Vermeidung von Proteinaggregaten wurde bei der Vorbereitung der Proben zur Flachbett-Fokussierung darauf geachtet, daß die Proteine gut gelöst vorlagen. Von Gineitis und Mitarbeitern (1978) konnten bei Proteinen, die nur in 9,5 M Harnstoff gelöst waren, Polypeptidkomplexe und Aggregate von Proteinen mit Ampholinen feststellen, die eine Auftrennung erschwerten. Aus diesem Grund wurden die Proteine vor der hier beschriebenen Auftrennung in der Flachbett-Fokussierung durch 10 M Harnstoff, 3,5 % Mercaptoäthanol und 1 % Triton X-100 in Lösung gebracht. Dennoch wurden Proteine mit gleichem Molekulargewicht über einen breiten pH-Bereich fokussiert. Dies gilt besonders für die 48K und 46K Proteine, die am SV40-Chromatin in großen Konzentrationen vorliegen (siehe Abb. 7). Durch Elution der Proteine nach der Fokussierung aus den einzelnen Fraktionen und Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Virusstrukturproteine von der Ziege konnte gezeigt werden, daß es sich dabei nicht um Proteinaggregate handelt, die über den gesamten pH-Bereich aufgetrennt wurden, sondern daß in den Fraktionen der Flachbett-Fokussierung verschiedene Proteine mit gleichem Molekulargewicht nachzuweisen sind, wie folgender Versuch beweist. Aus den Fraktionen 17-19 der Auftrennung des SV40-Chromatins (siehe Abb. 7b) konnte VP1 (48K) durch Immunpräzipitation erfaßt werden, während die 48K Proteine der übrigen Fraktionen nicht mit dem Immunserum reagierten. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei diesen Proteinen um SV40-stimulierte zelluläre Proteine handelt, die nicht mit dem Virusstrukturproteine identisch sind.

Da eine exakte pH-Wertbestimmung bei Auftrennungen im Harnstoffsystem nicht möglich ist (O'Farrell, 1975), können für die Proteine nur relative IEP angegeben werden, die sich bei Auftrennung der gleichen Proteine in anderen Gelsystemen (zweidimensionale Auftrennung, PAGIF - SDS-PAGE) unterschieden können. Bei Proteinen, die über mehrere Fraktionen und somit in einem größeren pH-Bereich aufgetrennt werden, kann angenommen werden, daß es sich um das gleiche Polypeptid in unterschiedlich modifizierten Formen handelt. Die Derivate dieser Proteine unterscheiden sich nicht durch ihre elektrophoretische Mobilität, sondern durch unterschiedliche isoelektrische Punkte (O'Farrell, 1975; Zechel, 1977). Im Falle des VP1-Moleküls konnte von O'Farrell und Goodman (1976) die Phosphorylierung von zwei der fünf Untereinheiten des Proteins nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung findet an den Serinresten der beiden Komponenten statt (Tan und Sokol, 1972). Durch diese Modifikation ändert sich der IEP dieser Moleküle um 0,1 pH-Einheiten.

Durch Auftrennung von chromosomalen Proteinen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) konnten nach SV40-Infektion bei 59 Proteinspezies Veränderungen im NHCP-Muster nachgewiesen werden (siehe Abb. 12a). Durch Vergleich des chromosomalen Proteinmusters aus schein- und SV40-infizierten Zellen konnten 33 SV40-induzierte NHCP in einem pH-Bereich von 5,2-7,05 mit Molekulargewichten von 88K-23K erfaßt werden. Gleichzeitig konnten auch die viruscodierten Virusstrukturproteine VP1 (48K, pH 6,3-6,8), VP2 (44K, pH 6,3) und VP3 (32K, pH 6,8) nachgewiesen werden. Durch Untersuchungen mit AraC wurde die Identifizierung dieser Proteine ermöglicht.
Bei 14 NHCP, die auch am Chromatin der scheininfizierten Zelle vorliegen, konnte nach SV40-Infektion eine Stimulierung der Proteinsynthese festgestellt werden.
12 Proteine konnten nach SV40-Infektion nur noch

mit reduzierter Konzentration gegenüber der Kontrollprobe nachgewiesen werden.
Durch Vergleich des NHCP-Musters aus schein- und SV40-infizierten Zellen konnte nachgewiesen werden, daß 7 Proteine, deren Synthese 24 Stunden nach Scheininfektion stimuliert ist, sich am Chromatin der SV40-infizierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt nicht darstellen lassen. Ihre Synthese wird entweder durch spezifische Faktoren des Zellysats, die im SV40-Lysat nicht vorhanden sind, angeregt, oder das SV40-Lysat enthält Faktoren, die sich hemmend auf die Synthese dieser Proteine auswirken.
Bei 15 NHCP konnte eine stimulierte Synthese sowohl durch Zellysat als auch durch SV40-Lysat nachgewiesen werden. Dieser Befund kann die Notwendigkeit der Scheininfektion der Kontrollzellen vor Aufarbeitung verdeutlichen, um bei SV40-stimulierten Proteinen eine 'unspezifische' Anregung der Synthese durch Bestandteile des Zellysats auszuschließen.
Ein Protein, das entsprechend seinem IEP und Molekulargewicht (pH 6,1, 46K) als Aktin erkannt werden konnte, wurde in allen zweidimensionalen Darstellungen der NHCP nachgewiesen (siehe Abb. 8b, 9, 10, 11, 12, 13a-m, 21).

Die Unterscheidung von Proteinen hinsichtlich ihres genetischen Ursprungs in viruscodierte, virusinduzierte und virusstimulierte Proteine zu einem Zeitpunkt nach Infektion in der zweidimensionalen Gelelektrophorese, wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Diese Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß es durch die Infektion nicht nur zur Synthese viruscodierter Proteine, sondern auch zur Induktion wirtszellcodierter Proteine nach SV40-Infektion und zur stimulierten Synthese bereits vorhandener Proteine in der Zelle kommt. Auch der hemmende Effekt der SV40-Infektion auf einzelne Proteine, die nach Scheininfektion in der Zelle synthetisiert wurden, konnte bisher nicht beschrieben werden und stellt ein interessantes Phänomen dar, das in Zukunft näher untersucht werden soll.

Obwohl die Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese eine empfindliche Nachweismethode darstellt, gibt es hierbei einige Ansatzpunkte zur Methodenkritik. Trotz der Verwendung von Ampholyten des pH-Bereichs 3-10 konnten nach Durchführung der Fokussierung und Messung der pH-Gradienten nur Werte von pH 4-8 erfaßt werden. Wie Untersuchungen von O'Farrell und Mitarbeitern (1977) zeigten, werden durch die reduzierte Ausbildung des pH-Gradienten im basischen Bereich Proteine mit stark basischem IEP nicht dargestellt, weil diese Proteine nicht in das Fokussiergel einwandern. Da bei den hier beschriebenen Untersuchungen das besondere Interesse auf die NHCP gerichtet ist, die vornehmlich einen sauren IEP besitzen (Elgin und Bonner, 1972; Wu et al., 1973; Elgin und Stumph, 1975), war es trotzdem möglich, mit der obengenannten Methode Unterschiede im Muster der NHCP nach SV40-Infektion nachzuweisen.

Bei einzelnen Proteinspezies wie z.B. T- und t-Antigen, deren IEP eher im neutralen pH-Bereich liegt (pH 6,5-6,9 und 7,2), kommt es zu Schwierigkeiten bei der Auftrennung in der PAGIF (Crawford und O'Farrell, 1979). Diese Proteine neigen zur Selbstaggregation und bilden Komplexe, die sich durch den Probenpuffer, trotz seines hohen Gehalts an Harnstoff, Mercaptoäthanol und Triton X-100, nicht vollständig lösen lassen. Ihre Auftrennung in der ersten Dimension war nicht in jedem Fall erfolgreich (vergl. Abb. 12a und 16). So muß erwartet werden, daß gleiche Probleme wie sie für die T-Antigenspezies beschrieben wurden, auch auf andere Proteinklassen zutreffen können. Dieses Risiko wurde zunächst in Kauf genommen, die Methode muß jedoch in Hinsicht auf die Löslichkeit der Proteine vor Auftrennung in der PAGIF noch weiter verbessert werden.
Trotz dieser Einschränkung bietet diese Methode zur Analyse komplexer Polypeptidmuster eine bessere Darstellungsmöglichkeit SV40-spezifisch veränderter Proteine als z.B. die Flachbett-Fokussierung.

Untersuchungen des NHCP-Komplexes nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden in der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte die Identifizierung von SV40-spezifischen Proteinen in noch größerem Umfang ermöglichen. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten mehr als 130 Proteine nachgewiesen werden, deren Verhalten direkt von der SV40-Infektion abhängig ist, sei es, daß sie nach Infektion induziert oder stimuliert werden, sei es, daß sie unterschiedliche Verweilzeiten am Chromatin aufwiesen als die entsprechenden Proteine des Kontroll-Chromatins. In den Abbildungen 13a-m und in Tabelle 2 sind nur einige beispielhafte Proteine dargestellt, um bestimmte Verhaltensweisen der NHCP zu charakterisieren.
Durch dieses Experiment konnte festgestellt werden, daß eine große Anzahl von Proteinen schon während des Markierungszeitraums an das Chromatin bindet. Die größte Anzahl markierter Proteine ist am Kontroll- und SV40-Chromatin nach 45 minütigem 'chase' nachzuweisen. Einige Proteine sind während des gesamten Untersuchungszeitraums (0-90 min 'chase') stabil mit dem Chromatin verbunden. Zu dieser Proteinklasse gehört das Aktin und der VP1-Komplex (mit Ausnahme der Komponente 55, die nach 60 minütigem 'chase' nicht mehr nachweisbar ist, siehe Abb. 13k).
Die virusinduzierten Proteine, die bei diesem Experiment erfaßt wurden, sind mit Ausnahme eines 36K Proteins (IEP 7,14), das über 60 Minuten mit dem Chromatin assoziiert ist, nur für kurze Zeit mit dem Chromatin verbunden. Sehr wahrscheinlich erfüllen sie zu dieser Zeit eine regulatorische Funktion an der DNS und werden danach degradiert. Einige dieser Proteine werden über längere Zeit in der Zelle synthetisiert und durch Neusynthese ständig ersetzt. Dies konnte durch eine zweistündige Inkubation mit radioaktiven Aminosäuren, direkt vor Aufarbeitung, 24 Stunden nach Infektion, und zweidimensionale Auftrennung der Proteine (siehe Abb. 12) gezeigt werden. Dies ist bei den SV40-induzierten Proteinen mit den Molekulargewichten 44K, 32K und 70K der Fall.

Das Virusstrukturprotein VP1 bindet zwar bis zur letzten der untersuchten 'chase'-Perioden an das Chromatin, ist jedoch nach 60 minütigem 'chase' weniger stark nachzuweisen. Dieser Proteinkomplex wird nach seiner Ablösung vom Chromatin nicht degradiert, sondern wandert ins Zytosol und kann daraus durch Antiserum gegen SV40-Virionen 24 Stunden nach Infektion präzipitiert werden (nicht gezeigt).

Durch dieses 'pulse-chase'-Experiment ließen sich weitere virusspezifisch veränderte Proteine am Chromatin nachweisen, die jedoch weder virusinduziert noch virusstimuliert sind. Charakteristisch für diese Proteine ist ihre Verweilzeit am Chromatin, die durch die SV40-Infektion beeinflußt wird. Als Beispiele wurden 8 Proteine genannt, die sowohl am Kontroll- als auch am SV40-Chromatin nachzuweisen sind, die jedoch am SV40-Chromatin entweder früher oder später erscheinen als am Kontroll-Chromatin oder die früher oder später vom DNS-Proteinkomplex abgelöst werden als die Proteine der entsprechenden Kontrollprobe. Die veränderte Verweilzeit der Proteine am Chromatin nach SV40-Infektion läßt auf eine regulatorische Funktion dieser Proteine am Genom schließen. Solche Proteine sind nur durch ein solches 'pulse-chase'-Experiment zu erfassen.

Die Untersuchungen mit den verschiedenen ein- und zweidimensionalen Methoden konnten verdeutlichen, daß durch Kombination empfindlicher Nachweismethoden eine größere Anzahl von Proteinen nachzuweisen ist, die durch die Infektion der Zellen induziert, stimuliert oder in ihrem Verhalten nach SV40-Infektion verändert vorliegen, als durch eindimensionale Auftrennung (vergleiche: SDS-PAGE - 8 virusspezifische Proteine; PAGIF - SDS-PAGE nach 'pulse-chase'-Markierung - 130 SV40-spezifisch veränderte Proteine).
In der Literatur sind derartig detaillierte Analysen der NHCP aus SV40-infizierten Zellen, wie sie in dieser Arbeit dargestellt sind, bislang nicht beschrieben worden.

Zweidimensionale Analysen wurden zumeist mit Gesamtzellhomogenaten oder mit chromosomalen Proteinen anderer Zellinien durchgeführt. So wurden von Bravo und Celis (1980) Zellextrakte von 3T3 und SV3T3 Zellen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Dabei konnten 33 Proteine aus den Kontrollzellen (3T3-Zellen) auch in den SV40-transformierten SV3T3-Zellen nachgewiesen werden. 10 Proteinspezies der Kontrollzellen wurden in den transformierten Zellen nur noch mit verminderter Konzentration nachgewiesen. Vergleiche anhand der Molekulargewichte und der IEP der beschriebenen Proteine ließen keine Übereinstimmung mit den aus schein- und SV40-infizierten Zellen nachgewiesenen NHCP erkennen.
Von Peterson und McConkey wurden die NHCP aus HeLa-Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus analysiert. Die Autoren beschreiben am Chromatin dieser Zellen mehr als 450 Proteinspezies, die teilweise auch im Zytosol und im Nucleoplasma nachzuweisen sind (60 Proteine). Ein dominierendes Protein, das bei ihren Auftrennungen als NHCP identifiziert werden konnte, ist das Aktin. Dieses Protein wurde auch bei allen zweidimensionalen Auftrennungen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, nachgewiesen. Aktin scheint in der Zelle multifunktionelle Aufgaben zu erfüllen. Neben der Erhaltung der zytoplasmatischen Struktur (Hitchcock, 1977) besteht eine Funktion dieses Proteins im Transport von heterogener nukleärer RNS vom Kern ins Zytoplasma (Pagoulatos et al., 1978). Lazarides und Lindberg (1974) schreiben dem nukleären Aktin eine Schutzfunktion für die DNS als natürlichen DNase-Hemmer zu. Dies könnte auch die Funktion sein, die Aktin an der SV40-DNA erfüllt, wenn es bei der Isolierung des SV40-Nucleoproteinkomplexes an der DNS nachgewiesen wird (Milavetz et al., 1980).

Weitere Aufschlüsse über Veränderungen der NHCP in infizierten Zellen könnten gewonnen werden, wenn man Untersuchungen zum Nachweis chemischer Modifikationen der

Proteine oder ein 'pulse-chase'-Experiment zu einem anderen Zeitpunkt nach Infektion durchführen würde.

Die Weiterführung derartiger Analysen erscheint dann besonders sinnvoll, wenn sie dazu dienen, einige Proteinspezies, die von speziellem Interesse sind, durch Bindungsstudien an den DNS-Proteinkomplex in ihrer Funktion näher zu charakterisieren.

III. Darstellung von viruscodierten Proteinen am Chromatin der infizierten Zellen nach Immunpräzipitation

Durch Untersuchungen mit verschiedenen immunologischen Methoden wie der Immunpräzipitationstechnik und der indirekten Immunfluoreszenz konnten zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion viruscodierte Proteine erfaßt werden. Hierbei handelt es sich um verschiedene T-Antigenspezies (T- und t-Antigen) und die Virusstrukturproteine VP1, VP2 und VP3.

T-Antigen konnte mit verschiedenen Antiseren vom Chromatin und aus dem Zytosol der infizierten Zellen präzipitiert werden. t-Antigen wurde nur aus dem Zytosol der infizierten Zellen nachgewiesen. Bei den Untersuchungen durch Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß nicht alle Immunseren, die in der Immunfluoreszenz die für das T-Antigen typische Kernfluoreszenz zeigen, die Fähigkeit besitzen, die gleichen T-Antigenspezies zu präzipitieren.

Es sei noch einmal kurz zusammengefaßt, welche Antiseren in der Lage sind, T-Antigenspezies nachzuweisen:

1. Serum von tumortragenden Hamstern, die durch SV40-transformierte H65/90B-Zellen hervorgerufen werden.
2. Serum vom Affen gegen autologe, SV40-infizierte Nierenzellen.
3. IgG-Fraktion des Serums von der Ziege gegen partiell gereinigte SV40-Virionen.
4. Serum vom Kaninchen gegen Chromatin aus SV40-infizierten CV-1 Zellen, 48 Stunden nach Infektion.

5. Serum vom Kaninchen gegen Chromatin aus SV40-transformierten AGMK-EVa Zellen.

Die hier verwendeten Antiseren können hinsichtlich ihrer Fähigkeit, T-Antigenspezies zu präzipitieren, in drei Gruppen unterteilt werden:

1. Seren, die vom Chromatin T-Antigen und aus dem Zytosol T- und t-Antigen präzipitieren können (Hamster-, Affenserum).
2. Ein Serum, das das T-Antigen vom Chromatin und aus dem Zytosol nachweisen kann (Kaninchen Anti SV40-Chromatinserum, 48 Stunden nach Infektion).
3. Seren, die T-Antigen nur als chromosomales Protein erkennen können (IgG-Fraktion des Ziegenserums, Kaninchenserum gegen AGMK-EVa-Chromatin).

Diese Befunde weisen darauf hin, daß in der SV40-infizierten CV-1 Zelle T-Antigen in verschiedenen immunologischen Varianten vorliegt. Das Hamster- und das Affenserum enthalten Antikörper sowohl gegen die chromosomale als auch gegen die zytoplasmatische Form des T-Antigens, zusätzlich können diese Seren auch t-Antigen präzipitieren. Das Kaninchen Anti SV40-Chromatinserum 48h p.i. erkennt das chromatingebundene T-Antigen, welches dem Kaninchen bei Immunisierung als NHCP verabreicht wurde. Gleichzeitig präzipitieren diese Antikörper jedoch auch ein T-Antigen aus dem Zytosol, nicht jedoch das t-Antigen. Dieser Befund beweist, daß t-Antigen in der permissiven CV-1 Zelle nach Infektion mit SV40 nicht als chromosomal gebundenes Protein vorliegt. Da T- und t-Antigen übereinstimmende Aminosäuresequenzen am N-terminalen Ende zeigen, können die vom Kaninchen produzierten Antikörper gegen das T-Antigen nicht gegen antigene Determinanten dieser Region gerichtet sein. Wäre dies der Fall, müßte man erwarten, daß auch mit dem Kaninchen Anti-Chromatinserum das t-Antigen aus dem Zytosol der infizierten Zelle präzipitiert würde.

Die dritte Gruppe von Seren, die Antikörper gegen T-Antigen enthalten, stammen von der Ziege (gegen partiell gereinigte SV40-Virionen) und vom Kaninchen (gegen Chromatin aus transformierten AGMK-EVa Zellen). Die

Antikörper dieser Seren präzipitieren nur ein chromosomales T-Antigen.
Da die Ziege gegen SV40-Virionen, gewonnen aus einer Gradientenfraktion, die als kosedimentierende Proteine unter anderem T-Antigen enthielt, immunisiert wurde, besteht die Möglichkeit, daß dem Tier nur eins der verschiedenen T-Antigenmoleküle, nämlich das chromosomale, injiziert wurde. Die IgG-Fraktion des Ziegenserums enthielt keine Antikörper gegen die zytoplasmatische Form des T-Antigens.
Am Chromatin der AGMK-EVa Zellen liegt ebenfalls nur ein T-Antigen vor, das in seinen antigenen Determinanten von den zytoplasmatischen T-Antigenmolekülen (T- und t-Antigen) abweicht.
Da sowohl die Antikörper gegen das AGMK-EVa-Chromatin als auch das Hamster Anti T-Serum das chromosomale T-Antigen aus lytisch infizierten CV-1 Zellen präzipitieren können, muß es partielle Übereinstimmung der antigenen Determinanten der chromosomalen T-Antigenspezies aus lytisch infizierten und transformierten Zellen geben.

Aus der Literatur geht hervor, daß sich T-Antigenspezies aus SV40-transformierten und -infizierten Zellen hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterscheiden (Ahmad-Zadeh et al., 1976; Rundell et al., 1977; Simmons et al., 1978; Smith et al., 1968). Carroll und Smith (1976) konnten nachweisen, daß T-Antigen aus SV40-transformierten Zellen ein höheres Molekulargewicht aufweist (94K) als aus lytisch-infizierten Zellen (84K). Durch Isolierung der T-Antigen spezifischen mRNS-Moleküle aus beiden Zellsystemen konnte von dieser Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, daß bei in vitro Translation T-Antigen aus infizierten Zellen ebenfalls in Form eines 94K Proteins synthetisiert wird. Untersuchungen mit Proteasehemmern konnten verdeutlichen, daß in infizierten Zellen das T-Antigen in Form des 94K Proteins vorliegt, bei Entzug des Hemmstoffs wird T-Antigen über eine 89K Intermediärform zu einem 84K Protein abgebaut. Für diese unterschied-

lichen T-Antigenspezies werden in der transformierten und infizierten Zelle verschiedene biologische Funktionen postuliert. Vermutlich benötigt die transformierte Zelle zur Aufrechterhaltung dieses Status das 94K T-Antigen, während für die lytisch-infizierte Zelle zur Initiation der zellulären und viralen DNS-Replikation eine niedermolekulare Form des T-Antigens erforderlich ist.

Ein Hinweis darauf, daß T-Antigen auch in der lytisch infizierten Zelle in unterschiedlichen Spezies (chromosomal gebundene und zytoplasmatische Form), mit gleichem Molekulargewicht vorliegt, gibt auch die Immunpräzipitation mit dem Affenserum aus Proben des Chromatins und des Zytosols der infizierten Zelle. Während T-Antigen aus dem Zytosol bereits 9 Stunden nach Infektion nachzuweisen ist, erscheinen die ersten T-Antigenmoleküle am Chromatin erst 15 Stunden nach Infektion (mit dem gleichen Serum immunpräzipitiert). Dieser zeitliche Unterschied spricht dafür, daß es sich bei der zytoplasmatischen und der chromosomalen T-Antigenspezies um Moleküle handelt, die zu verschiedenen Zeiten nach Infektion synthetisiert werden und möglicherweise verschiedene antigene Determinanten besitzen. Aller Wahrscheinlichkeit nach erfüllen diese T-Antigene in der Zelle unterschiedliche Funktionen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen (Prives et al., 1977; Rundell et al., 1977) konnte nachgewiesen werden, daß T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen sowohl eine Affinität zu SV40-DNS als auch zu Kalbsthymus-DNS aufweist. Dies zeigt, daß sie als DNS-bindende Proteine der Klasse der NHCP angehören, während für das t-Antigen keine solche Affinität zur DNS festzustellen war. Da die T-Antigenspezies nicht zu 100 % an die DNS binden, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß in der Zelle verschiedene Formen von T-Antigenmolekülen vorliegen, die in ihrer Bindungseffizienz zur DNS variieren. Durch

unterschiedliche Modifikationen kann die Affinität zur DNS beeinflußt sein. Neusynthetisierte T-Antigenmoleküle binden zu einem höheren Prozentsatz an die DNS als Moleküle, die bereits längere Zeit in der Zelle vorliegen und in dieser Zeit modifiziert werden (Oren et al., 1980; Prives et al., 1980).

Gleichzeitig mit den T-Antigenspezies konnten mit dem Hamster Anti-T-Serum verschiedene NHCP mit den Molekulargewichten 76K, 70K, 53K, 48K, 46K, 24K und 23K vom Chromatin der infizierten Zellen immunpräzipitiert werden. Für die 48K und 46K Proteine konnte nach Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (siehe Abb. 16) anhand ihres charakteristischen Proteinmusters festgestellt werden, daß es sich um VP1 bzw. Aktin handelt. VP1 wird unspezifisch präzipitiert, da das Hamster Anti T-Serum keine Antikörper gegen dieses Protein enthält (vergl. die Befunde des Neutralisationstests). Durch eigene Befunde und nach Untersuchungen von Smith et al. (1978) konnte für den VP1-Komplex eine hohe Affinität zur Staphylokokkenoberfläche nachgewiesen werden. Auch das Aktin wird mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht spezifisch durch das Hamsterserum präzipitiert. Von Flanagan und Koch (1978) konnte eine starke Komplexierung von Aktin mit IgG-Molekülen nachgewiesen werden. Diese Aggregate werden bei Zugabe von Staphylokokken über das Fc-Stück des Immunglobulins an das Zellwandprotein A des Bakteriums gebunden.
Alle weiteren immunpräzipitierten NHCP sind entweder T-Antigen verwandte Proteine oder zelluläre Proteinspezies, die mit dem T-Antigen komplexieren.
Für das 70K Protein kann sowohl die eine wie die andere Möglichkeit zutreffen. Von Prives und Mitarbeitern (1977) konnte nach in vitro Translation einer frühen mRNS ein 70K Protein synthetisiert werden, das sehr wahrscheinlich ein Abbauprodukt einer höher molekularen T-Antigenspezies darstellt, und mit Anti T-Serum immunpräzipitiert werden konnte. Lane und Hoeffler (1980) hingegen konnten aus

SV40-transformierten SV80 Zellen ein 68K Protein mit einem monoklonalen Antikörper gegen T-Antigen präzipitieren. Durch Präzipitation des gleichen Proteins aus nicht transformierten Zellen konnte eine Kreuzreaktion des zellulären Polypeptids mit T-Antigen nachgewiesen werden. Die Autoren postulieren für dieses wirtszellcodierte Protein ähnliche Funktionen am zellulären Genom, wie sie das T-Antigen am viralen Genom erfüllt (z.B. Initiation der zellulären DNS-Synthese).
Ob das mit Hamster Anti T-Serum aus SV40-infizierten CV-1 Zellen immunpräzipitierte 70K Protein mit einem der oben beschriebenen Proteine übereinstimmt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.
Das zelluläre 53K Protein wird mit der T-Antigenspezies, die vom Hamster Anti T-Serum am Chromatin der SV40-infizierten Zelle erkannt wird, aller Wahrscheinlichkeit nach kopräzipitiert. Proteine im Molekulargewichtsbereich von 48-56K werden mit Anti T-Serum und monoklonalen T-Antikörpern von verschiedenen Arbeitsgruppen aus SV40-infizierten und transformierten Zellen präzipitiert (Kress et al., 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979; Yang et al., 1979; Luborsky und Chandrasekaran, 1980; Melero et al., 1980). Von Harlow et al. (1981) wurde ein 53K Protein aus SV40-infizierten CV-1 Zellen beschrieben, das zusammen mit T-Antigen durch einen monoklonalen Antikörper gegen eine T-Antigen Determinante zu präzipitieren ist. Das 53K Protein ist wirtszellcodiert und bildet in der SV40-infizierten und in verschiedenen transformierten Zellen Komplexe mit dem T-Antigen. Dieses Protein ist mit geringeren Konzentrationen mit einem monospezifischen Serum gegen das 53K Protein auch aus den Kontrollzellen zu präzipitieren. Das 53K Protein aus Affenzellen ist analog zu einem Protein aus infizierten und transformierten Mauszellen (Gurney et al., 1980), es wird mit einem monoklonalen Antiserum gegen das Maus-53K-Protein präzipitiert. Die Komplexierung des zellu-

lären Proteins mit dem viralen T-Antigen weist auf eine mögliche Virus-Wirts Interaktion in der Zelle hin, die sowohl für die lytische Infektion als auch für transformationsspezifische Prozesse eine wichtige Rolle spielt.
Über die Funktion und den genetischen Ursprung der niedermolekularen 24K und 23K Proteine kann bislang keine Auskunft gegeben werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß es sich bei diesen Proteinen um Degradationsprodukte höher molekularer Proteinspezies handelt.
Auf das 76K Protein wurde bislang noch nicht näher eingegangen, da es in den Abschnitten IV und V der Diskussion noch ausführlich diskutiert werden soll.

Als weitere viruscodierte Proteine konnten VP1, VP2 und VP3 am Chromatin (siehe Abb. 18) und VP1 im Zytosol (siehe Abb. 19) der infizierten Zellen nachgewiesen werden. Durch Immunfluoreszenz mit Ziegenserum gegen SV40-Virionen, das auf CV-1 Zellen und AGMK-EVa Zellen voradsorbiert war, ließ sich in den infizierten Zellen eine starke Kernrandfluoreszenz nachweisen, die darauf schließen läßt, daß Virusstrukturproteine im Zellkern in Nähe der Kernmembran lokalisiert sind (Kasamatsu und Nehorayan, 1979).
Durch Immunpräzipitation mit der IgG-Fraktion des Ziegenserums gegen SV40-Virionen ließ sich VP1 am Chromatin bereits 15 Stunden nach Infektion nachweisen, im Zytosol erscheint VP1 in präzipitierbarer Form jedoch erst 18 Stunden nach Infektion. Daß VP1 aus dem Zytosol zu späteren Zeiten nach Infektion nicht in größerer Konzentration nachzuweisen ist, liegt daran, daß 24-48 Stunden nach Infektion bereits SV40-Virionen zusammengesetzt werden, die nach Zentrifugation des Zytosols bei 105.000xg sedimentieren und daher im Überstand nur noch die löslichen VP1-Moleküle erfaßt werden können.
VP2 und VP3 konnten ebenfalls am Chromatin der infizierten Zelle nachgewiesen werden. Wie mit Hilfe der 'pulse-

chase'-Kinetik (siehe Abb. 13a-m) gezeigt werden konnte, hat VP2 nur eine kurze Verweilzeit am Chromatin (erscheint nach 15 Minuten 'pulse' und ist nach 30 Minuten 'chase' nicht mehr nachweisbar). VP1 und VP3 binden hingegen über längere Zeit (90 Minuten bzw. 60 Minuten) am Chromatin. VP2 stellt sich bei zweidimensionaler Auftrennung in zwei Untereinheiten dar, die sich in ihrem IEP und Molekulargewicht geringfügig unterscheiden. Es wird vermutet, daß dieses Strukturprotein in verschiedenen Modifikationen in der Zelle vorliegt.
Alle Antiseren, die sich im Neutralisationstest als positiv erwiesen haben (siehe Ergebnisteil III.1) konnten vom Chromatin und aus dem Zytosol VP1 präzipitieren. Dies spricht dafür, daß im Neutralisationstest Antikörper gegen VP1 nachgewiesen werden.
VP2 und VP3 konnten am Chromatin nach 'pulse-chase'-Markierung (siehe Abb. 20) erst 24 Stunden nach Infektion erfaßt werden. Nach 2-stündiger Markierung (22-24h p.i.) sind sie in angereicherter Form am Chromatin nachzuweisen (siehe Abb. 18). Aus den Zytosolproben konnte VP2 und VP3 mit keinem der hier verwendeten Seren präzipitiert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß VP2 und VP3 im Kern lokalisiert sind oder im Zytoplasma membrangebunden vorliegen, so daß sie aus dem 105.000xg Überstand nicht präzipitiert werden können.

IV. Verhalten von virus- und wirtszellcodierten Proteinen nach Behandlung der Zellen mit einem Hemmstoff der DNS-Replikation

Untersuchungen mit SV40-infizierten, AraC-behandelten permanenten Affenierenzellen (CV-1) zeigten in der Immunfluoreszenz eine starke Verminderung der T-Antigen spezifischen Kernfluoreszenz (siehe Abb. 14d). Da zur Produktion von T-Antigen keine Replikation der viralen DNS benötigt wird (Carp et al., 1969), wird angenommen,

daß AraC auf verschiedene Reaktionen des Zellmetabolismus Einfluß ausübt. Zum Beispiel konnte nach AraC-Behandlung der reduzierte Einbau von ^{35}S-Methionin in NHCP der Kontrollzellen (Reduktion um 11 %) und der SV40-infizierten Zellen (Reduktion um 36 %) beobachtet werden.

Nach zweidimensionaler Auftrennung von NHCP aus SV40-infizierten CV-1 Zellen (siehe Abb. 8a und 8b) konnten nach AraC-Behandlung die Virustrukturproteine nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich waren Proteine mit den Molekulargewichten 86K (T-Antigen), 32K, 24K und 21K nicht mehr darzustellen. Ein 34K Protein konnte nach AraC-Behandlung der Zellen nur noch mit geringer Konzentration erfaßt werden.

Überraschenderweise findet nach AraC-Behandlung jedoch auch eine Induktion der Proteinsynthese statt. Neu am Chromatin der SV40- (siehe Abb. 6b) und der scheininfizierten CV-1 Zellen (nicht gezeigt) treten die Proteine mit den Molekulargewichten 62K, 60K, 48K und 46K auf. Da diese Proteine in den Kontroll- und in den infizierten Zellen gleichermaßen erscheinen, und diese Proteine nicht mit jenen identisch sind, die durch unspezifischen Stimulus, wie Mediumwechsel, induziert werden, muß angenommen werden, daß durch AraC die Synthese einiger Proteine in der Zelle angeregt wird. Welche Funktion diese Proteine erfüllen, kann zur Zeit nicht geklärt werden.

T-Antigen ist nach zweidimensionaler Auftrennung unter AraC-Einfluß aufgrund seiner geringen Konzentration nicht mehr nachweisbar. Durch Untersuchungen mit der Immunfluoreszenz- und der Immunpräzipitationstechnik läßt sich jedoch darstellen, daß die T-Antigen Synthese zwar deutlich gegenüber der unbehandelten, infizierten Zelle reduziert erscheint, daß es in geringen Konzentrationen aber noch nachweisbar ist.

Zur Immunpräzipitation wurden verschiedene Antiseren gegen Chromatin aus scheininfizierten, SV40-infizierten und NKS-stimulierten CV-1 Zellen, jeweils 24 Stunden nach Stimulation bzw. Infektion, eingesetzt.

Keines der Seren konnte die Virusstrukturproteine VP1-VP3 nach AraC-Behandlung der Zellen präzipitieren. Das Anti-SV40-Chromatinserum erkennt zusätzlich zu den Proteinspezies, die auch vom Anti-Kontroll-Chromatinserum präzipitiert werden, noch die Polypeptide mit den Molekulargewichten 88K, 86K (T-Antigen) und 34K. Prominente Proteine, die von diesem Serum als SV40-induzierte Proteinspezies vom Chromatin der infizierten Zelle ohne AraC-Behandlung erfaßt werden, wie die 76K, 70K, 62K, 42K, 40K, 38K, 36K und 28K Spezies, können nach AraC-Behandlung mit dem gleichen Serum nicht mehr nachgewiesen werden.

Zur Erklärung dieser Versuchsergebnisse sollen folgende Annahmen diskutiert werden:

1. Die Synthese dieser Proteine ist DNS-Replikationsabhängig (von der zellulären oder von der viralen DNS).
2. AraC hat tiefgreifende Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zelle (siehe Reduktion des Einbaus an radioaktiven Aminosäuren), die auch die Synthese verschiedener zellulärer und viruscodierter Proteine betreffen.
3. Die in ihrer Synthese gehemmten Proteine des SV40-Chromatins sind nicht zellulären Ursprungs, sondern viruscodierte Proteine, die mit den Virusstrukturproteinen verwandt sind.

Die unter Punkt 1 und 2 genannten Interpretationen scheinen für die gehemmten Proteine am ehesten zuzutreffen. Es ist bekannt, daß die Synthese der Virusstrukturproteine von der viralen DNS-Replikation abhängig ist. Ähnliche Abhängigkeiten könnten auch für zelluläre, virusinduzierte Proteine von der zellulären DNS-Synthese postuliert werden. Da AraC eine Hemmung des Einbaus von radioaktiven Aminosäuren in die Zellproteine bewirkt, besteht die Möglichkeit, daß die Synthese wichtiger Enzyme des Proteinstoffwechsels unterbleibt. Durch diese Hemmung wären zelluläre wie viruscodierte Proteine gleichermaßen betroffen. Die unter Punkt 3 dargestellte Annahme, daß alle Proteine,

deren Synthese durch AraC-Behandlung verhindert wird, viruscodierte Polypeptide sind, kann anhand einiger Befunde widerlegt werden: da auch vom Chromatin der scheininfizierten CV-1 Zellen nach AraC-Behandlung Proteine in ihrer Synthese gehemmt sind, ist dieser Effekt auch in der virusindizierten Zelle sicherlich nicht nur auf viruscodierte Proteine beschränkt.
Durch Untersuchungen von NHCP aus infizierten Zellen zu verschiedenen Zeiten nach 'pulse'-Markierung (siehe Abb. 23) durch Immunpräzipitation mit verschiedenen Anti SV40-Chromatinseren konnte nachgewiesen werden, daß Proteine wie die 88K, 76K, 62K oder 38K Spezies sich bei diesem Experiment grundsätzlich anders verhalten als die Virusstrukturproteine, so daß ein direkter Zusammenhang der hier beschriebenen Proteine mit den Strukturproteinen des SV40-Virions wenig wahrscheinlich erscheint. Weitere Anhaltspunkte für die Identifizierung dieser Proteine als zellulär codierte Polypeptide werden unter Punkt V ausführlicher diskutiert.

Die Wirkungsweise von AraC auf den Metabolismus der Zelle konnte bislang noch nicht umfassend aufgeklärt werden. Folgende Tatsachen sind jedoch bekannt: AraC verhindert die Umwandlung von Cytidin-Nucleotiden in Desoxycytidin (Cohen, 1966). Durch diese Hemmung werden verschiedene Prozesse der DNS-Replikation beeinflußt. Von Fridland (1977) konnte bei Lymphozyten eine blockierte Initiation der DNS-Replikation 20-30 Minuten nach Zugabe des Hemmstoffs nachgewiesen werden. Weiterhin wird die Elongation von naszierenden DNS-Strängen nach Zugabe von AraC gehemmt (Rajalakshmi und Sarma, 1975; Wist et al., 1976). Sehr wahrscheinlich wird die Synthese einer DNS-Ligase, die Verbindungen zwischen neusynthetisierten DNS-Fragmenten herstellt, blockiert.
Eine große Anzahl von Untersuchungen mit Cytosinarabinosid wurde an virusinfizierten Zellen durchgeführt, um Aufschluß über die Synthese viruscodierter Proteine zu bekommen. Von Anderson und Gesteland (1972) wurde

nachgewiesen, daß in SV40-infizierten BSC-1 Zellen nach AraC-Behandlung sowohl die zelluläre als auch die virale DNS-Synthese gehemmt wird. Während die zelluläre DNS-Synthese zu 70 % reduziert wird, ist die virale DNS-Replikation vollständig blockiert.

Durch die Hemmung der viralen DNS-Synthese wird die Produktion der Virusstrukturproteine in der infizierten Zelle unterdrückt (Rapp et al., 1965a; Rapp et al., 1965b; Butel und Rapp, 1965; Anderson und Gesteland, 1972; Fischer und Sauer, 1972; Khandjian et al., 1980).
Die Synthese von mRNS und die Produktion von T-Antigen wird nur in begrenztem Umfang durch AraC beeinflußt (Manteuil und Girard, 1974). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz und Komplementbindungsreaktion konnte in SV40-infizierten primären Affennierenzellen (GMK) nach AraC-Behandlung, 18-24 Stunden nach Infektion, in 25-50 % der Zellen T-Antigen nachgewiesen werden (Melnick et al., 1964; Gilden et al., 1965; Butel und Rapp, 1965). Vielfach wurde jedoch eine atypische Verteilung der Fluoreszenz in Form von Kernrandeffekten und diffuser Kernfluoreszenz beschrieben (Rapp et al., 1965a).

Die Literaturbefunde hinsichtlich einer Hemmung der Virusstrukturprotein-Synthese in SV40-infizierten Zellen nach AraC-Behandlung, konnte durch die eingenen Befunde bestätigt werden. Bei der Synthese des T-Antigens konnte in dieser Arbeit eine Auswirkung von Cytosinarabinosid in verstärktem Umfang dargestellt werden. Dies mag einerseits auf die Verwendung permanenter CV-1 Zellen zurückzuführen sein, da sich die oben dargestellten Literaturbefunde im wesentlichen auf Untersuchungen mit primären Affennierenzellen beziehen, bei denen sich der Einfluß des Hemmstoffs möglicherweise in anderer Form auswirkt als in den permanenten Zellen. Andererseits wurden die Untersuchungen, die bislang in der Literatur beschrieben sind, nicht mit einer solch empfindlichen Methode durchgeführt, wie sie die Immunpräzipitation darstellt.

Neu ist jedoch der Befund, daß Cytosinarabinosid die Synthese einiger Proteine sowohl in schein- als auch in SV40-infizierten Zellen induziert. Daraus kann abgeleitet werden, daß diese Droge außer der Hemmung der DNS-Synthese noch weitere Einflüsse auf den Stoffwechsel der Zelle ausübt.

V. Charakterisierung einiger SV40-spezifisch induzierter chromosomaler Proteine

Bei der Darstellung von chromosomalen Proteinen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten am Chromatin der SV40-infizierten Zelle eine große Anzahl zellulärer NHCP nachgewiesen werden, die nach Infektion induziert oder stimuliert erscheinen. Untersuchungen durch Immunpräzipitation von chromosomalen Proteinen mit verschiedenen Antiseren sollten das Verhalten einiger SV40-spezifischer Proteine näher charakterisieren. Durch die Immunpräzipitationen ließen sich folgende nicht viruscodierte Proteine erfassen: 100K/97K, 88K, 84K, 76K, 70K, 66K, 62K, 53K, 48K, 42K, 40K, 38K, 36K, 34K, 33K, 29K, 28K, 27K, 25K, 24K, 22,5K, 19K.

Einige dieser Proteine konnten nach Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht dargestellt werden. Hier macht sich der Vorteil der Immunpräzipitation bemerkbar, da durch hochaffine Antikörper Antigene, die in geringen Konzentrationen in der Zelle vorhanden sind, angereichert werden und somit in der SDS-PAGE nachzuweisen sind. Um eine Charakterisierung dieser Proteine vorzunehmen und ihre mögliche Funktion am Chromatin zu diskutieren, muß festgestellt werden, welche Beziehung diese Proteinklassen zu den viruscodierten Proteinen haben.

Proteine, die aufgrund einer Stimulierung durch SV40-Infektion vermehrt in der Zelle vorliegen, sind durch

das zelluläre Genom codiert und sollten daher keine strukturelle Verwandtschaft zu den viruscodierten Proteinen aufweisen. Dies sind z.B. Proteine mit dem Molekulargewicht 100/97K, 34K, 29K, 27K, 25K, 24K und 22,5K. Bei diesen Proteinen könnte es sich um Enzyme handeln, die an Prozessen des Zellmetabolismus, die durch die Infektion angeregt werden wie z.B. die DNS-Synthese oder die Proteinsynthese, beteiligt sind.

Im folgenden soll auf einige virusinduzierte Proteine näher eingegangen werden:
Das 88K Protein stellt sich als zelluläres Protein dar, da es sich in seinem Verhalten von den viruscodierten Proteinen unterscheidet. Dieses Protein wird weder mit dem Hamster Anti-Tumorserum noch mit dem Affenserum präzipitiert. Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, daß dieses Protein genetische Verwandtschaft mit T-Antigen aufweist. Das 88K Protein wird von dem Kaninchen Anti SV40-Chromatinserum und dem Anti AGMK-EVa-Serum 18 Stunden nach Infektion erstmals erfaßt. Es gehört also zu den Proteinen, die erst nach Beginn der viralen DNS-Replikation am Chromatin nachzuweisen sind. Das 88K Protein wird bei 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden am Chromatin bis 30 Minuten nach Markierung angereichert (siehe Abb. 23). Danach wird das Protein vom Chromatin langsam abgelöst, es ist nach 90 minütigem 'chase' jedoch noch mit geringer Konzentration nachzuweisen. Das Protein hat einen IEP von 6,0 (siehe Abb. 12a) und ist in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nur nach zweistündiger Markierung darzustellen. Sein Verhalten nach AraC-Behandlung der Zellen gleicht dem des T-Antigens. Beide Proteine können durch den reduzierten Einbau an ^{35}S-Methionin nicht in gleicher Konzentration dargestellt werden wie in der nicht behandelten Zelle.
Durch Präzipitation dieses Proteins mit einem Antiserum gegen Chromatin aus NKS-stimulierten Zellen kann ausgeschlossen werden, daß das 88K Protein vom viralen Ge-

nom codiert wird. Die Synthese dieses Proteins ist sowohl durch SV40 als auch durch Serumstimulation zu induzieren, damit stellt es sich zwar als SV40-induziertes, nicht jedoch als SV40-spezifisches Protein dar.

Ein ebenfalls sehr interessantes Polypeptid ist das 76K Protein. Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht 70-74K werden von verschiedenen Autoren beschrieben (Walter et al., 1972; Tegtmeyer, 1975; Patschinsky, 1980). Während von Tegtmeyer und Walter die nachgewiesenen 72K und 70K Proteine als zelluläre Spezies erkannt wurden, schließt Patschinsky für das von ihm nachgewiesene 74K Protein eine Verwandtschaft mit dem T-Antigen nicht aus, da dieses Protein durch Hamster Anti T-Serum präzipitiert werden kann. Meiner Meinung nach kann eine Beziehung des 76K Proteins, das durch verschiedene Antiseren (Hamster Anti-T, Ziegen Anti SV40-Virion, Kaninchen Anti SV40-Chromatin, Kaninchen Anti AGMK-EVa-Chromatin) zu präzipitieren war, zu viruscodierten Proteinen aus verschiedenen Gründen nicht in Betracht kommen:

1. Das 76K Protein läßt sich bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese als Protein, das in zwei Untereinheiten aufgetrennt ist, nachweisen. Diese Untereinheiten haben isoelektrische Punkte von 6,2 und 6,6. Damit zeigen sie weder Übereinstimmung zu den IEP des T-Antigens (6,5-6,9) noch zu dem des VP1 (6,7-6,9).
2. Das 76K Protein ist erst 18 Stunden nach Infektion durch Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti SV40-Chromatinserum am Chromatin nachzuweisen, das T-Antigen wird mit dem gleichen Serum bereits 12 Stunden nach Infektion nachgewiesen.
3. Bei 'pulse-chase'-Experimenten wird das 76K Protein nach 30 Minuten 'chase' am Chromatin angereichert nachgewiesen, es bleibt mit relativ starker Konzentration bis 90 Minuten nach Markierung am Chromatin assoziiert (siehe Abb. 23). Das T-Antigen erscheint direkt nach Markierung am Chromatin in der

gleichen Konzentration, mit der es für 30 Minuten gebunden bleibt und wird dann bis zum 90-minütigem 'chase' teilweise abgelöst. Auch die VP1-Moleküle verhalten sich in dieser Hinsicht anders. Sie werden bis 60 Minuten nach Markierung stark angereichert, bevor sie nach 90-minütigem 'chase' mit geringerer Konzentration nachgewiesen werden.

4. Im Gegensatz zu T-Antigen, ist das 76K Protein nach AraC-Behandlung nicht mehr nachzuweisen, dies spricht für eine DNS-Replikationsabhängige Synthese dieses Proteins.

Ob eine strukturelle Verwandtschaft des 76K Proteins mit VP1 vorliegt, kann im Augenblick nicht geklärt werden. Die Hemmung der Synthese durch AraC ist bislang der einzige Hinweis auf den gemeinsamen Ursprung beider Proteine. Andere Parameter, wie das Verhalten bei der 'pulse-chase'-Kinetik oder der IEP bei der Auftrennung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Immunpräzipitation (siehe Abb. 21) sprechen nicht für die Übereinstimmung des 76K Proteins mit dem VP1. Weitere Untersuchungen, die diese Frage klären soll, werden von einer Arbeitsgruppe unseres Lehrstuhls durchgeführt, so daß dieses Problem wohl in Kürze geklärt werden kann.

Mit dem 62K Protein konnte am Chromatin ein SV40-induziertes Protein erfaßt werden, das nach AraC-Behandlung der Zellen nicht mehr darstellbar ist (siehe Abb. 24). Seine Synthese ist daher von der zellulären oder viralen DNS-Synthese abhängig. Dieses Protein erscheint nach 'pulse-chase'-Markierung erst 30 Minuten nach Inkubation mit ^{35}S-Methionin am Chromatin der infizierten Zelle und ist zum nächsten Aufarbeitungszeitpunkt (45 min. 'chase') nicht mehr zu erfassen.
Am Chromatin wird dieses Protein 18 Stunden nach Infektion durch Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti SV40-Chromatinserum erstmals nachgewiesen. 24 Stunden nach Infektion kann es in größeren Konzentrationen

aus der SV40-Chromatinprobe präzipitiert werden (siehe Abb. 20).
Nach zweidimensionaler Auftrennung zeigt das Protein zwei Untereinheiten, die bei pH 6,2 und 6,6 fokussieren (siehe Abb. 21). Dieses Protein konnte vom Hamster Anti T-Serum und vom Affenserum nicht präzipitiert werden. Es erscheint somit unwahrscheinlich, daß es eine Beziehung zu den T-Antigenspezies aufweist. Seine isoelektrischen Punkte und das Verhalten bei 'pulse-chase'-Markierung lassen keine genetische Verwandtschaft mit den Virusstrukturproteinen erwarten.
In den letzten Jahren wurden in der Literatur eine Reihe von Proteinen des Molekulargewichtsbereichs 56K-62K beschrieben, die zellulären Ursprungs sind und aus verschiedenen transformierten und infizierten Zellen präzipitiert wurden (Chang et al., 1979; Kress et al., 1979; Gaudray et al., 1978; Mora et al., 1980; Linzer und Levine, 1979; DeLeo et al., 1979; Luborsky und Chandrasekaran, 1980; Smith et al., 1979). Diese wirtszellcodierten Proteine aus Zellen verschiedener Spezies konnten jedoch alle mit Hamster Anti T-Seren oder Antiseren gegen gereinigte T-Antigenspezies präzipitiert werden. Für die meisten dieser Proteine wurde eine intrazelluläre Komplexierung mit T-Antigen nachgewiesen. Die hier gezeigten Befunde lassen nicht darauf schließen, daß das 62K Protein in diese Klasse der T-Antigen gebundenen Proteine einzureihen ist. Es handelt sich bei diesem Protein aller Wahrscheinlichkeit nach um ein regulatorisches Protein, das möglicherweise dazu beiträgt, in der infizierten Zelle einige, für die Virusproduktion elementaren Prozesse, im Sinne eines zellulären T-Antigens zu regulieren (Lane und Hoeffler, 1980).

24 Stunden nach Infektion konnte bei zweidimensionaler Auftrennung von Immunpräzipitaten der NHCP aus infizierten Zellen mit Kaninchen Anti SV40-Chromatin-

serum (siehe Abb. 21) und nach Darstellung von NHCP aus SV40-infizierten Zellen in der Flachbett-Fokussierung (siehe Abb. 7c) ein 48K Protein nachgewiesen werden, das sich aufgrund seines IEP deutlich vom VP1-Komplex unterscheidet. Dieses Protein ist zellulären Ursprungs, da es auch am Chromatin der Kontrollzellen in schwacher Konzentration nachzuweisen ist. Von Melero et al. (1980) konnte ein SV40-induziertes 48K Protein in transformierten und infizierten Mauszellen nachgewiesen werden. Durch tryptische Verdauung mit V8-Protease wurde dargestellt, daß dieses Protein keine Ähnlichkeit mit T-Antigen oder den T-Antigen assoziierten 55-60K Proteinen zeigt. Ob das 48K Protein aus SV40-infizierten Zellen mit dem von Melero nachgewiesenen Protein übereinstimmt, muß durch V8-Verdauung des angereicherten Proteins und Fingerprintanalysen geprüft werden.

Bei den niedermolekularen, virusinduzierten Proteinspezies mit den Molekulargewichten 42K, 40K, 38K, 36K, 33K, 28K, 22,5K und 19K konnte festgestellt werden, daß sie durch die Seren, die Antikörper gegen T-Antigen in größeren Mengen enthalten, nicht aus der Chromatinprobe präzipitiert werden konnten. Eine immunologische Verwandtschaft mit diesem Protein ist damit auszuschließen. Die Proteine werden in besonders großen Konzentrationen durch das Anti SV40-Chromatinserum zu den späten Zeitpunkten nach Infektion präzipitiert. Auch bei diesen Proteinen scheint es sich um zellulärcodierte Proteine zu handeln. Das 42K Protein fokussiert bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit zwei Untereinheiten bei pH 6,0. Dieses Protein wird durch das Anti-ACMK-EVa-Serum 18 Stunden nach Infektion mit schwacher Konzentration auch am Kontroll-Chromatin nachgewiesen. Am SV40-Chromatin liegt es jedoch nach stimulierter Synthese in höheren Konzentrationen vor. Das Anti SV40-Chromatinserum kann dieses 42K Protein nur am SV40-Chromatin erkennen. Das läßt darauf schließen, daß beide

Proteine unterschiedliche Determinanten aufweisen, wobei das 42K Protein aus infizierten Zellen vermutlich SV40-spezifisch modifiziert wurde und durch Immunisierung mit SV40-Chromatin speziell gegen diese Determinante Antikörper induziert wurden. Am AGMK-EVa-Chromatin liegen möglicherweise beide Formen dieses Proteins vor, oder es wurden Antikörper gegen eine Determinante induziert, die beide Proteine gemeinsam tragen.
Auch bei den anderen niedermolekularen Proteinspezies, die nur am Chromatin der SV40-infizierten Zelle nachzuweisen sind, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um zelluläre Proteine, deren Synthese durch die Infektion der CV-1 Zellen angeregt wurde.

Es ist schwer, über die Funktion dieser zellulären Proteine Aussagen zu machen. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise darauf, daß es sich bei solchen virusinduzierten Proteinen um Polypeptide handelt, die von Genen codiert werden, die während einer bestimmten Phase der Embryogenese aktiv waren und durch Infektion oder Transformation der Zellen reaktiviert werden (Linzer und Levine, 1979; Luborsky und Chandrasekaran, 1980; Mora et al., 1980).
Mora und Mitarbeiter (1980) konnten nachweisen, daß 55K Proteine, die aus verschiedenen SV40-transformierten Zellen unterschiedlicher Tierspezies isoliert wurden und als zelluläre Proteine dargestellt werden konnten, ähnliche Peptidmuster bei der partiellen Verdauung aufweisen konnten, wie ein 55K Protein aus embryonalen Karzinomzellen, die nicht durch SV40 transformiert waren. Ähnliche Proteine konnten auch in Maussarkomzellen und bei Leukämie, hervorgerufen durch verschiedene äthiologische Agenzien, nachgewiesen werden (DeLeo et al., 1979).
Dieses 55K Protein konnte in primären Zellkulturen von 12-14 Tage alten Mäuseembryonen isoliert werden. Durch Vergleich der Peptidmuster der extrahierten Proteine konnte eine Identität beider Proteinspezies nachgewiesen werden. Bei Passage der embryonalen Zellkulturen

exprimierten die Zellen dieses Protein nicht mehr. Auch in Mäuseembryonen, die älter als 14 Tage waren, konnte dieses Protein nicht mehr nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, daß dieses Protein nur zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung synthetisiert wird.
Es kann aus diesen Befunden geschlossen werden, daß in der Zelle Gene, die bei der Embryonalgenese von Bedeutung sind, konserviert werden und bei entsprechendem Stimulus, z.B. SV40-Infektion, reaktiviert werden. Daß diese Proteine auch in SV40-infizierten Zellen nachzuweisen sind, konnte von Simmons (1980) dargestellt werden. Durch zweidimensionale Peptidanalyse konnte die Übereinstimmung des embryonalen und des zellulären 55K Proteins aus lytisch infizierten Zellen nachgewiesen werden.
Ob ähnliche Reaktivierungsmechanismen embryonaler Antigene auch für andere Proteinklassen zutreffen, müssen weitere Untersuchungen zeigen und sind in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit dargestellten zellulären, virusinduzierten Proteinen von größtem Interesse.

Für die in dieser Arbeit dargestellten wirtszellcodierten Proteine können ähnliche Funktionen in der Zelle postuliert werden wie für die T-Antigenspezies, z.B. Stimulierung der zellulären DNS-Synthese, Initiation der Transkription wichtiger Enzyme des Stoffwechsels oder spezifische Enzymaktivitäten.
Um diese Funktionen zu überprüfen, müssen die in Frage kommenden Proteine gereinigt und angereichert werden. Durch Mikroinjektion einzelner Proteinspezies in ruhende Zelle sollte die Auswirkung dieser Polypeptide auf den Stoffwechsel nicht infizierter Zellen untersucht werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob diese Proteine Enzymaktivitäten aufweisen. Eine Beziehung der Proteine untereinander und zu Proteinen aus transformierten oder embryonalen Zellen könnte durch proteolytische Spaltung der isolierten Proteinspezies, mit anschließender Peptidanalyse, erfolgen.

Darüberhinaus müßten monoklonale Antikörper gegen die einzelnen Proteine hergestellt werden, um Untersuchungen über die Komplexierung dieser zellulären Proteine mit viruscodierten Proteinen durchführen zu können. Durch Immunpräzipitation mit diesen monospezifischen Antiseren, aus Extrakten verschiedener embryonaler Zellinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gestation sollte versucht werden, diese Proteine als embryonale Antigene zu identifizieren.
Dem Problem der verschiedenen T-Antigenspezies, die in der Zelle mit unterschiedlichen Immunseren zu erfassen sind, könnte man durch Charakterisierung verschiedener antigener Determinanten eines Proteins begegnen. Dies könnte z.B. durch Infektion der Zellen mit verschiedenen SV40-Mutanten, die Deletionen in definierten Genombereichen aufweisen, und anschließender Immunpräzipitation mit Anti T-Seren geschehen. Weiterhin könnte durch monospezifische Antikörper gegen verschiedene T-Antigen Determinanten die T-Antigenspezies aus lytisch infizierten und SV40-transformierten Zellen näher charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollten auch sekundäre Veränderungen der antigenen Determinanten, die in Form von Modifikationen des Proteins auftreten könnten, durch Nachweis von Glykosylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Azetylierung usw., untersucht werden.

Da eine Reihe von virusinduzierten, wirtszellcodierten Proteinen aus lytisch infizierten Zellen mit einem Antiserum gegen AGMK-EVa Chromatin präzipitiert wurden (siehe Abb. 22), muß angenommen werden, daß die Proteinzusammensetzung des Chromatins aus SV40-infizierten und -transformierten Zellen partielle Übereinstimmung zeigt. Ob es sich bei diesen gemeinsamen zellulären Proteinen um Polypeptide handelt, die an der Aufrechterhaltung der Transformation beteiligt sind, soll in Zukunft überprüft werden. Untersuchungen des Einflusses dieser Proteine auf den Metabolismus einer nicht infizierten Zelle könnten dazu beitragen, die Entwicklung einer Zelle in eine neoplastische Zelle zu verfolgen und den Prozess der Zelltransformation zu verstehen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, virusspezifische Veränderungen am Chromatin der SV40-infizierten Zellen zu untersuchen und das Verhalten dieser Proteine durch Analyse des Proteinmusters mit verschiedenen ein- und zweidimensionalen Methoden zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion und nach Immunpräzipitation mit verschiedenen Antiseren zu charakterisieren. Dabei wurden am Chromatin viruscodierte, virusinduzierte, virusstimulierte Proteine und Polypeptide, deren Verweilzeit am Chromatin durch SV40-Infektion beeinflußt wird, erfaßt.

Anhand des Einbaus von radioaktivem ^{35}S-Methionin in NHCP konnte 24h p.i. als Zeitpunkt ermittelt werden, zu dem virusspezifische Veränderungen am Chromatin der SV40-infizierten Zelle zu erwarten sind. 0-3 Stunden nach Infektion wird der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Proteine der infizierten Zelle reduziert.

Analysen des chromosomalen Proteinmusters in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Infektion durch die eindimensionale SDS-PAGE ließen 15 Stunden nach Infektion erste Veränderungen im Proteinmuster der NHCP aus infizierten Zellen erkennen. 24h p.i. konnten 8 SV40-induzierte bzw. -stimulierte Proteine mit den Molekulargewichten 88K, 86K, 76-72K, 48-44K, 36K und 29K nachgewiesen werden.

Durch die Auftrennung von Chromatinproteinen in der Flachbett-Fokussierung mit anschließender Analyse des Proteinmusters in der SDS-PAGE konnten 24h p.i. mehr als 20 SV40-spezifische Proteine dargestellt werden. Dabei wurden Proteine mit den Molekulargewichten 84K, 80K, 76K, 58K, 50K, 48K, 45K, 41K, 28K, 26K und 20K erfaßt, die sowohl am Kontroll- als auch am SV40-Chromatin nachgewiesen wurden, deren unterschiedlicher IEP jedoch darauf schließen läßt, daß es sich um verschiedene Proteinspezies handelt.

Durch die zweidimensionale Gelelektrophorese (PAGIF - SDS-PAGE) Oh und 24h p.i. konnten bei 59 Proteinspezies Veränderungen im NHCP-Muster des SV40-Chromatins festgestellt werden. Dabei konnten durch Vergleich des chromosomalen Proteinmusters aus schein- und SV40-infizierten Zellen 33 SV40-induzierte und 14 SV40-stimulierte Proteine, im Molekulargewichtsbereich von 88K-23K mit isoelektrischen Punkten von pH 5,2 - 7,05, erfaßt werden. Bei 12 NHCP wurde eine Reduktion der Syntheserate nach SV40-Infektion nachgewiesen und 7 Proteine des Kontroll-Chromatins konnten 24h p.i. am Chromatin der infizierten Zelle nicht mehr dargestellt werden. Die Synthese von 15 NHCP konnte am Chromatin der Kontroll- wie der SV40-infizierten Zellen 24h p.i. mit erhöhter Konzentration nachgewiesen werden.
Aktin konnte als NHCP am Chromatin der schein- und SV40-infizierten Zellen erkannt werden.

Zweidimensionale Analysen des Proteinmusters nach 'pulse-chase'-Markierung mit verschieden langen 'chase'-Perioden konnten das Verhalten von NHCP durch ihre Bindung an das Chromatin charakterisieren. Bei diesen Untersuchungen konnten ca. 130 Proteinspezies erfaßt werden, die entweder viruscodiert, virusinduziert oder virusstimuliert sind, oder deren Verweilzeit am Chromatin nach SV40-Infektion verändert wird. Die Verweilzeiten einiger Proteine am Chromatin wurden analysiert.

Durch Untersuchungen mit verschiedenen immunologischen Methoden wie der Immunfluoreszenz und der Immunpräzipitation konnten SV40-spezifische Proteine in der infizierten Zelle erfaßt werden.

T-Antigen und die Virusstrukturproteine VP1, VP2 und VP3 konnten durch Immunpräzipitation mit verschiedenen Antiseren als chromosomale Nicht-Histon-Proteine charakterisiert werden.

T-Antigen liegt in der SV40-infizierten Zelle in verschiedenen immunologischen Varianten vor. T-Antigen wird 9 Stunden nach Infektion im Zytosol und 15 h p.i. am Chromatin durch Immunpräzipitation erfaßt. t-Antigen konnte nur aus dem Zytosol, und zwar mit der 12. Stunde nach Infektion durch Immunpräzipitation erfaßt werden.

Durch 'pulse-chase'-Kinetik konnte gezeigt werden, daß die Strukturproteine VP1 und VP3 über längere Zeit (90 bzw. 60 min) stabil mit dem DNS-Proteinkomplex verbunden bleiben. VP2 hat nur eine kurze Verweilzeit (15 min) am Chromatin. VP1 und VP2 lassen sich bei zweidimensionaler Darstellung in verschiedene Komponenten auftrennen (VP1 - 5 Komponenten, VP2 - 2 Komponenten).

Nach Behandlung der Zellen mit AraC, einem Hemmstoff der DNS-Synthese, konnten die Virusstrukturproteine, nach Analyse in der zweidimensionalen Gelelektrophorese und nach Immunpräzipitation nicht mehr nachgewiesen werden. Die T-Antigensynthese wird durch diesen Hemmstoff reduziert. AraC hat ebenfalls Einfluß auf die Proteinsynthese zellulärcodierter Proteine: Polypeptide mit den Molekulargewichten 32K, 24K und 21K konnten nach Behandlung der Zellen mit der Droge nicht mehr erfaßt werden. Eine AraC-abhängige Induktion der Synthese findet hingegen bei Proteinen mit den Molekulargewichten 62K, 60K, 48K und 46K statt.

Als wirtszellcodierte, virusstimulierte Proteine konnten vom Chromatin der SV40-infizierten Zellen nach Immunpräzipitation mit Antiseren gegen Chromatin aus lytisch infizierten Zellen und transformierten Zellen Proteine mit den Molekulargewichten 100/97K, 34K, 29K, 25K, 24K und 22,5K nachgewiesen werden.

Als virusinduzierte, wirtszellcodierte Proteinspezies wurden Polypeptide mit den Molekuargewichten 88K, 84K, 76K, 70K, 66K, 62K, 53K, 48K, 42K, 40K, 38K, 36K, 33K, 28K und 19K durch verschiedene Antiseren vom SV40-Chromatin präzipitiert.
Für die 70K und 53K Proteine konnte durch Immunpräzipitation mit dem Hamster Anti T-Serum eine Verwandtschaft mit dem Tumor-Antigen diskutiert werden.
Die übrigen virusinduzierten Proteine zeigen keine Übereinstimmung mit den viruscodierten Proteinen, wie Untersuchungen durch Immunpräzipitation nach 'pulse-chase'-Markierung, nach zweidimensionaler Auftrennung und nach AraC-Behandlung der Zellen mit anschließender Immunpräzipitation verdeutlichen konnten.

Es wird diskutiert, daß die virusinduzierten Proteine aus lytisch infizierten Zellen möglicherweise mit embryonalen Antigenen und Proteinen aus Karzinomzellen und transformierten Zellen Übereinstimmung zeigen und gleiche Funktionen erfüllen wie diese Proteine.

G. L I T E R A T U R

C. Ahmad-Zadeh, B. Allet, J. Greenblatt, R. Weil	Two forms of Simian-Virus-40-specific T-antigen in abortive and lytic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. US 73: 1097-1101 (1976)
V.G. Allfrey, V.C. Littan, A.E. Mirsky	On the role of histones in the regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. US 49: 414-421 (1963)
Y. Aloni, E. Winocour, L. Sachs	Characterization of the Simian Virus 40-specific RNS in virus-yielding and transformed cells. J. Mol. Biol. 31: 415-429 (1968)
F.A. Anderer, M.A. Koch, H.D. Schlumberger	Structure of Simian Virus 40. III. Alkaline degradation of the virus particle. Virology 34: 452-458 (1968)
C.W. Anderson & R.F. Gesteland	Pattern of protein synthesis in monkey cells infected by Simian Virus 40. J. Virol. 9: 758-765 (1972)
G. Barbanti-Brodano, P. Swetly, H. Koprowski	Early events in the infektion of permissive cells with SV40: adsorption, penetration and uncoating. J. Virol. 6: 78-86 (1970)
T. Barrett, D. Maryanka, P.H. Hamlyn, H.J. Gould	Nonhistone proteins control gene expression in reconstituted chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. US 71: 5057-5061 (1974)
S.M. Berget, C. Moore, P.A. Sharp	Spliced segments at the 5' terminus of Adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. US 74: 3171-3175 (1977)
A.J. Berk & P.A. Sharp	Spliced early mRNAs of Simian Virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. US 75: 1274-1278 (1978)
N. Bouck, N. Beales, T. Shenk, P. Berg, Cr. DiMayorca	New region of the Simian Virus 40 genome required for efficient viral transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. US 75: 2473-2477 (1978)

S. Bratosin, M. Horowitz, O. Laub, Y. Aloni — Electron microscopic evidence for splicing of SV40 late mRNAs. Cell 13: 783-790 (1978)

W. Büttner & H. Werchau — Incorporation of 5-iodo-2'-deoxyuridin (IUdR) into SV40 DNA. Virology 52: 553-561 (1973)

H. Busch, L.C. Yeoman, R.K. Busch, J.J. Jordan, M.S. Rao, C.W. Taylor, B.C. Win — Antigenically active nonhistone chromatin proteins in cancer cells. Cancer Res. 36: 3399-3408 (1976)

J.S. Butel & F. Rapp — The effects of arabinofuranosylcytosine on the growth cycle of Simian Virus 40. Virology 27: 490-495 (1965)

R.J. Carp, G. Sauer, F. Sokol — The effect of Actinomycin D on the transcription and replication of Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid. Virology 37: 214-226 (1969)

R.B. Carroll, K. Muello, J.A. Melero — Coordinate expression of the 48K host nuclear phosphoprotein and SV40 T-antigen upon primary infection of mouse cells. Virology 102: 447-452 (1980)

R.B. Carroll & A.E. Smith — Monomer molecular weight of T-antigen from Simian Virus 40-infected and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 73: 2254-2258 (1976)

P. Chambon — The molecular biology of the eucariotic genome is coming of age. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 1209-1234 (1977)

C. Chang, D.T. Simmons, M.A. Martin, P.T. Mora — Identification and partical characterization of new antigens from Simian Virus 40-transformed mouse cell. J. Virol. 31: 463-471 (1979)

J.F. Chiu, Y.H. Tsai, K. Sakuma, L.S. Hnilica — Regulation of in vitro mRNA transcription by a fraction of chromosomal proteins. J. Biol. Chem. 250: 9431-9433 (1975)

T.G. Clark & R.W. Merriam — Diffusible and bound actin in nuclei of Xenopus laevis Oocytes. Cell 12: 883-891 (1977)

S.S. Cohen — Introduction to the biochemistry of D-arabinosyl nucleosides. Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 5: 1-88 (1966)

C.N. Cole, T. Landers, S.P. Goff, S. Manteuil-Brutlag, P. Berg
Physical and genetic characterization of deletion mutants of Simian Virus 40 constructed in vitro. J. Virol. 24: 277-294 (1977)

N.R. Cozzarelli
The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. Ann. Rew. Biochem. 46: 641-668 (1977)

L.V. Crawford & P.H. Black
The nucleic acid of Simian Virus 40. Virology 24: 388-392 (1964)

L.V. Crawford & P.Z. O'Farell
Effects of alkylation on the physical properties of Simian Virus 40 T-antigen species. J. Virol. 29: 587-596 (1979)

K.J. Danna & D. Nathans
Bidirectional replication of Simian Virus 40 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. US 69: 3097-3100 (1972)

A.B. DeLeo, G. Jay, E. Appella, G.C. Dubois, L.W. Law, L.J. Old
Detection of transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. US 76: 2420-2424 (1979)

M.L. DePamphilis, P. Beard, P. Berg
Synthesis of superhelical Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid in cell lysates. J. Biol. Chem. 250: 4340-4347 (1975)

R. Dulbecco, L.H. Hartwell, M. Vogt
Induction of cellular DNA synthesis by Polyoma Virus. Proc. Natl. Acad. Sci. US 53: 403-410 (1965)

B.E. Eddy, G.S. Borman, W.H. Berkley, R.D. Young
Tumor induced in hamsters by injection of Rhesus monkey kidney cell extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107: 191-197 (1961)

B.E. Eddy, G.S. Borman, G.E. Grubbs, R.D. Young
Identification of the oncogenic substances in Rhesus monkey kidney cell cultures as Simian Virus 40. Virology 17: 65-75 (1962)

S.C.R. Elgin & J. Bonner
Partical fractionation and chemical characterization of the major nonhistone chromosomal proteins. Biochemistry 11: 772-781 (1972)

S.C.R. Elgin & W.E. Stumph — Chemistry of the non-histone chromosomal proteins. Structure and function of chromatin. Ciba Foundation Symp. 28: 113-123 (1975)

S.C.R. Elgin & H. Weintraub — Chromosomal proteins and chromatin structure. Ann. Rew. Biochem. 44: 725-774 (1975)

G. Felsenfeld — Chromatin. Nature 271: 115-121 (1978)

W. Fiers, R. Contreras, G. Haegeman, R. Rogiers, A. van de Voorde, H. van Heuverswyn, J. van Herreweghe, G. Volkaert, M. Ysebaert — Complete nucleotid sequences of SV40 DNA. Nature 273: 113-120 (1978)

R.E. Fine & L. Taylor — Decreased actin and tubulin synthesis in 3T3 cells after transformation by SV40 virus. Exp. Cell Res. 102: 162-168 (1976)

H. Fischer & G. Sauer — Identification of virus-induced proteins in cells productively infected with Simian Virus 40. J. Virol. 9: 1-9 (1972)

J. Flanagan & G.L.E. Koch — Cross-linked suraface Igattackes to actin. Nature 273: 278-281 (1978)

A. Fridland — Effect of cytosine arabinoside on replicon initiation in human lamphoblasts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 74: 72-78 (1977)

P. Gaudray, M. Rassoulzadegan, F. Cuzin — Expression of Smian Virus 40 early genes in transformed rat cells is correlated with maintenance of the transformed phenotyp. Proc. Natl. Acad. Sci. US 75: 4987-4991 (1978)

R. Gerhards — Chromosomale Nicht-Histon-Proteine isoliert aus permanenten Zellkulturen von grünen Meerkatzen (Cercopithecus aethiops). Diplomarbeit, Bochum, 1977

E.L. Gershey & E.G. Diakumakos — Simian Virus 40 production after viral uncoating in the CV-1 cell nucleus. J. Virol. 28: 415-416 (1978)

V.R. Gilden, R.J. Carp, F. Taguchi, V. Defendi — The nature and localisation of the SV40 induced complement fixing antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. US 53: 684-692 (1965)

R.S. Gilmour, J.D. Windass, N. Affara, J. Paul — Control of transcription of the globine gene. J. Cell Physiol. 85: 449-458 (1975)

A.A. Gineitis, B. Anachkova, G. Russev — Failure of preparative flat bed electrofucussing to resolve rat liver chromosomal proteins. Anal. Biochem. 87: 157-161 (1978)

A.J. Girardi, B.H. Sweet, V.B. Slotnick, M.R. Hillemann — Development of tumors in hamsters inoculated in the neo-natal period with vacuolating virus SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 649-660 (1962)

L. Goldstein, R. Rubin, C. Ko — The presence of actin in nuclei: a critical appraisal. Cell 12: 601-608 (1977)

A. Graessmann, M. Graessmann, C. Mueller — Regulatory mechanism of Simian Virus 40 gene expression in permessive and in nonpermessive cells. J. Virol. 17: 854-858 (1976)

A. Graessmann, M. Graessmann, E. Guhl, C. Mueller — Quantitative correlation between Simian Virus 40 T-antigen synthesis and late viral gene expression in permissive and nonpermissive cells. J. Cell Biol. 77: R1-R8 (1978)

B.E. Griffin — Strucute and genomic organization of SV40 and Polyoma Virus. In "DNA tumor viruses", Ed. J. Tooze, Cold Spring Harbor Laboratory 61-123 (1980)

J.D. Griffin, G. Spangler, D.M. Livingston — Protein kinase activity associated with SV40 T antigen Proc. Natl. Acad. Sci. US 76: 2610-2614 (1979)

J.D. Griffith — Chromatin structure: deduced from a minichromosome. Science 187: 1202-1236 (1975)

E.G. Gurney, R.O. Harrison, J. Femo
Monoclonal antibodies against SV40 T-antigens: evidence for distinct subclasses of large T-antigen and for similarities among nonviral T-antigens.
J. Virol. 34: 752-763 (1980)

M.R. Hall, W. Meinke, D.A. Goldstein
Nucleoprotein complexes containing replicating Simian Virus 40 DNA: comparison with Polyoma nucleoprotein complexes.
J. Virol. 12: 901-908 (1973)

M. Hatanaka & R. Dulbecco
Induction of DNA synthesis by SV40.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 56: 736-740 (1966)

E. Harlow, D.C. Pim, L.V. Crawford
Complex of Simian Virus 40 large T-antigen and host 53.000 molecular weight protein in monkey cells.
J. Virol. 37: 564-573 (1981)

S.E. Hitchcock
Regulation of motility in non-muscel cells.
J. Cell Biol. 74: 1-15 (1977)

M. Horowitz, O. Laub, S. Bratosin, Y. Aloni
Splicing of SV40 late mRNA is a post-transcriptional process.
Nature 275: 558-559 (1978)

E.S. Huang, M.K. Estes, J.S. Pagano
Structure and function of the polypeptides in Simian Virus 40. I. Existence of subviral deoxynucleoprotein complexes.
J. Virol. 9: 923-929 (1972)

K. Hummeler, N. Tomassini, F. Sokol
Morphological aspects of the uptake of Simian Virus 40 by permessive cells.
J. Virol. 6: 87-93 (1970)

T. Hunter & B. Francke
In vitro Polyoma DNA synthesis: Inhibition by 1-ß-D-arabinofuranosyl CTP.
J. Virol. 15: 759-775 (1975)

Y. Ito, J.R. Brocklehurst, R. Dulbecco
Virusspecific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by Polyoma Virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 74: 4666-4670 (1977)

H. Kasamatsu &
A. Nehorayan
Intracellular localization of viral polypeptides during Simian Virus 40 infection.
J. Virol. 32: 648-660 (1979)

A.C. Kay & M.F. Singer
Histone synthesis during infection of monkey kidney cells with Simian Virus 40.
Nucleic Acid Res. 4: 3371-3386 (1977)

T.D. Kempe, W.G. Beattie, S. Weissman, W. Konigsberg
Correlation of the protein and nucleic acid sequences for the major structural protein of Simian Virus 40.
J. Biol. Chem. 254: 7561-7569 (1979)

S.W. Kessler
Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immunol. 115: 1617-1624 (1975)

E.W. Khandjian, J.M. Matter, N. Neonard, R. Weil
Simian Virus 40 and Polyoma Virus stimulate overall cellular RNA and protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 77: 1476-1480 (1980)

G. Khoury & E. May
Regulation of early and late Simian Virus 40 transcription: overproduction of early viral DNA in the absence of a functional T-antigen.
J. Virol. 23: 167-176 (1977)

E.D. Kiehn
Protein metabolism in SV40-infected cells.
Virology 56: 313-333 (1973)

R.H. Kirschner, M. Rusli, T.E. Martin
Characterization of the nuclear envelope, pore complexes and dense lamina of mouse liver nuclei by high resolution scanning electron microscopy.
J. Cell Biol. 72: 118-132 (1977)

H. Koprowski, F.C. Jensen, Z. Steplewski
Activation of production of infectious tumor virus SV40 in heterokaryon cultures.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 58: 127-133 (1967)

R.D. Kornberg
Structure of chromatin.
Ann. Rew. Biochem. 46: 931-955 (1977)

M. Kress, E. May, R. Cassingena, P. May	Simian Virus 40 transformed cells expressed new species of proteins precipitable by anti-Simian Virus 40 tumor serum. J. Virol. 31: 472-483 (1979)
M. Kress, C. de Vaux Saint-Cyr, M. Girard	The molecular weight of SV40 T-antigen. Inserm Coll. "Early proteins of oncogenic DNA viruses." Inserm 69: 79-92 (1977)
M.P. Kriegler, J.D. Griffin, D.M. Livingston	Phenotypic complementation of the SV40 tsA mutant defect in viral DNA synthesis following micro-injection of SV40 T antigen. Cell 14: 983-994 (1978)
K.K. Laemmli	Cleavage of structural proteins during the assembly of bacterio-phage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
R.S. Lake, S. Barban, N.P. Salzman	Resolution and identification of the core deoxynucleoproteins of the Simian Virus 40. Biochem. Biophys. Res. Comm. 54: 640-647 (1973)
D.P. Lane & L.V. Crawford	T-antigen is bound to a host pro-tein in SV40-transformed cells. Nature 278: 261-263 (1979)
D.P. Lane & W.K. Hoeffler	SV40 large T shares antigenic determinants with a cellular protein of molecular weight 68.000. Nature 288: 167-170 (1980)
D.P. Lane & A.K. Robbins	An immunochemical investigation of SV40 T-antigen. Virology 87: 182-193 (1978)
R.A. Laskey, B.M. Honda, A.D. Mills, J.T. Finch	Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers the to DNA. Nature 275: 416-420 (1978)
E. Lazarides & U. Lindberg	Actin is the naturally occuring inhibitor of deoxyribonuclease I. Proc. Natl. Acad. Sci. US 71: 4742-4746 (1974)
A.M. Lewis, M.J. Levin, W.H. Wiese, C.S. Crumpacker, P.H. Henry	A nondefective (competent) Adeno-virus-SV40 hybrid isolated from the AD2-SV40 hybrid population. Proc. Natl. Acad. Sci. US 63: 1128-1135 (1969)

P. Liberti, L. Fischer-Fantuzzi, C. Vesco — Kinetics of DNA and histone messenger RNA synthesis in CV-1 monkey kidney cells infected with Simian Virus 40. J. Mol. Biol. 105: 263-273 (1976)

C.C. Liew & P.K. Chan — Identification of nonhistone chromatin proteins in chromatin subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. US 73: 3458-3462 (1976)

D.M. Lindstrom & R. Dulbecco — Strand orientation of Simian Virus 40 transcription in productively infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 69: 1517-1520 (1972)

D.H. Linzer & A.J. Levine — Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17: 43-52 (1979)

O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, L. Farr, K.J. Randell — Protein messurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

S.W. Luborsky & K. Chandrasekaran — Subcellular distribution of Simian Virus 40 T-antigen species in various cell lines. Int. J. Cancer 25: 517-527 (1980)

J.V. Maizel — Polyacrylamidgel electrophoresis of viral proteins. Methods in Virology, K. Maramorosch, H. Koprowski (Eds.) Academic Press New York, Vol. 5: 179-246 (1971)

N.F. Man, G.E. Morris, R.J. Cole — Two dimensional analysis of nuclear proteins during muscle differentiation in vitro. Exp. Cell Res. 126: 375-382 (1980)

K. Mann & T. Hunter — Association of Simian Virus 40 T antigen with Simian Virus 40 nucleoprotein complexes. J. Virol. 29: 232-241 (1979)

S. Manteuil & M. Girard — Inhibitors of DNA-synthesis: their influence on replication and transcription of Simian Virus 40 DNA. Virology 60: 438-454 (1974)

K. Marushige & G.H. Dixon	Developmental changes in chromosomal composition and template activity during spermagenesis in Trout-testis. Develop. Biol. 9: 4440-4447 (1970)
A.M. Maxiam & W. Gilbert	A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. US 74: 560-564 (1977)
P. May, E. May, J. Bordé	Stimulation of cellular RNA synthesis in mouse-kidney cell cultures infected with SV40 virus. Exp. Cell Res. 100: 433-436 (1976)
A.J. McGillivray & D. Rickwood	MTP. Internation review of science, Vol. 9: 301 Ed. J. Butterworth, London
J.A. Melero, S. Tur, R.B. Carroll	Host nuclear proteins expressed in Simian Virus 40-transformed and -infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 77: 97-101 (1980)
J.L. Melnick	Papova virus group. Science 135: 1128-1130 (1962)
J.L. Melnick, S.E. Stinebaugh, F. Rapp	Incomplete Simian Papovavirus SV40 formation on non-infectious viral antigen in the presence of fluorouracil. J. Exp. Med. 119: 313-326 (1964)
B.I. Milavetz, L.D. Spotila, R. Thomas, J.A. Huberman	Two-dimensional analysis of proteins sedementing with Simian Virus 40 chromosomes. J. Virol. 35: 854-864 (1980)
P.T. Mora, K. Chandrasekaran, V.W. McFarland	An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. Nature 288: 722-724 (1980)
K. Oda & R. Dulbecco	Induction of cellular mRNA synthesis in BSC-1 cells infected by Simian Virus 40. Virology 35: 439-444 (1968a)
K. Oda & R. Dulbecco	Regulation of transcription of the SV40 DNA in productively infected and in transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 60: 525-532 (1968b)
P.H. O'Farrell	High resolution twodimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem 250: 4007-4021 (1975)

P.Z. O'Farrell, H.W. Goodman, P.H. O'Farrell	High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 12: 1133-1142 (1977)
P.Z. O'Farrell, H.M. Goodman	Resolution of Simian Virus 40 proteins in whole cell extracts by two-dimensional electrophoresis: heterogeneity of the major capsid protein. Cell 9: 289-298 (1976)
M. Oren, E. Winocour, J. Prives	Differential affinities of Simian Virus 40 large tumor antigen for DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. US 77: 220-224 (1980)
G.N. Pagoulatos & M. Yaniv	Proteins bound to heterogenous nuclear RNA of Simian-Virus-40-infected cells. Eur. J. Biochem. 91: 1-10 (1978)
R.C. Parker, A.M. Tobia, S.G. Baum, C.L. Schildkraut	DNA replication in synchronized cultured mammalian cells. V. The temporal order of synthesis of component DNA during monkey DNA synthesis induced by SV40 virus. Virology 66: 82-93 (1975)
G. Patel & T.Y. Wang	Chromatography and electrophoresis of nuclear soluble proteins. Exp. Cell Res. 34: 120-130 (1964)
T. Patschinsky	Induktion der Synthese eines 74K Proteins in Säugerzellen nach Infektion mit dem onkogenen Virus SV40 und nach Serumstimulation Dissertation, Bochum, 1978
E. Paucha, A. Mellor, R. Harvey, A.E. Smith, R.M. Herwick, M.D. Waterfield	Large and small tumor antigens from Simian Virus 40 have identical amino termini mapping at 0,65 map units. Proc. Natl. Acad. Sci. US 75: 2165-2169 (1978)
J. Paul & R.S. Gilmour	Organ-specific restriction of transcription in mammalian chromatin. J. Mol. Biol. 34: 305-316 (1968)
J.L. Peterson & E.M. McConkey	Non-histone chromosomal proteins from HeLa cells. J. Biol. Chem. 251: 548-554 (1976)

E.H. Postel & A.J. Levine — The requirement of Simian Virus 40 gene A product for the stimulation of cellular thymidine kinase activity after viral infection. Virology 73: 206-215 (1976)

C. Prives, Y. Beck, H. Shure — DNA-binding properties of Simian Virus 40 T-antigens synthezised in vivo and in vitro. J. Virol. 33: 689-696 (1980)

C. Prives & Y. Beck — Characterization of SV40 T-antigen polypeptides synthesized in vivo and in vitro. Inserm Coll. "Early proteins of oncogenic DNA viruses." Inserm 69: 175-186 (1977)

C. Prives, E. Gilboa, M. Revel, E. Winocour — Cell-free translation of Simian Virus 40 early messenger RNA coding for viral T-antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. US 74: 457-461 (1977)

B.J. Radola — Thin layer isoelectric focusing of proteins. Biochim. Biophys. Acta 194: 335-338 (1969)

S. Rajalakshmi & D.S.R. Sarma — In vivo chain elongation of hepatitic DNA: 1-ß-D-arabinofuranosyl cytosine sensitive and unsensitive steps. Biochem. Biophys. Res. Comm. 64: 331-335 (1975)

F. Rapp, J.S. Butel, L.A. Feldman, T. Kitahara, J. Melnick — Differential effects of inhibitors on the steps leading to the formation of SV40 tumor and virus antigens J. Exp. Med. 121: 935-944 (1965a)

F. Rapp, J.L. Melnick, T. Kitahara — Tumor and virus antigens of SV40: Differential inhibition of synthesis by cytosine arabinoside. Science 147: 625-627 (1965b)

V.B. Reddy, B. Thimmappaya, R. Dhar, K.N. Subramanian, B.S. Zain, J. Pan, P.K. Ghosh, L.M. Celma, S.M. Weissman — The genome of Simian Virus 40. Science 200: 494-502 (1978)

L.J. Reed & H. Muench — A simple method of estimating fifty per cent entpoints. Amer. J. Hyg. 27: 493-497 (1938)

G. Rovera, R. Baserga, V. Defendi — Early increase in nuclear acidic protein synthesis after SV40-infection. Nature, New Biol. 237: 240-241 (1972)

S. Rozenblatt, R.C. Mulligan, M. Gorecki, B.E. Roberts, A. Rich — Direct biochemical mapping of eucaryotic viral DNA by means of a linked transcription - translation cell-free system. Proc. Natl. Acad. Sci. US 73: 2747-2751 (1976)

R.W. Ruddon & C.H. Rainey — Stimulation of nuclear protein synthesis in rat liver after phenobarbital administration. Biochem. Biophys. Res. Comm 40: 152-160 (1970)

K. Rundell, J.K. Collins, P. Tegtmeyer, H.L. Ozer, Ch.J. Lai, D. Nathans — Identification of Simian Virus 40 protein A. J. Virol. 21: 636-646 (1977)

J. Sambrook & A.S. Shatkin — Polynucleotid ligase activity in cells infected with Simian Virus 40, Polyoma Virus, or Vaccinia Virus. J. Virol. 4: 719-726 (1969)

J. Sambrook, B. Sudgen, W. Keller, P.A. Sharp — Transcription of Simian Virus 40. III. Mapping of 'early' and 'late' species of RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. US 70: 3711-3715 (1973)

G. Sauer & J.R. Kidwai — The transcription of the SV40 genome in productively infected and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 61: 1256-1263 (1968)

M. Segawa, S. Sugano, N. Yamaguchi — Association of SV40 T-antigen with replicating nucleoprotein complexes of SV40. J. Virol. 35: 320-330 (1980)

H.M. Shein & J.F. Enders — Transformation induced by Simian Virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. Proc. Natl. Acad. Sci. US 48: 1164-1168 (1962)

K. Shiroki & H. Shimojo — Transformation of green monkey kidney cells by SV40 genome: The establishment of transformed cell lines and the repliation of human Adenoviruses and SV40 in transformed cells. Virology 45: 163-171 (1971)

D.T. Simmons	Characterization of Tau antigens isolated from uninfected and Simian Virus 40-infected monkey cells and Papovavirus transformed cells. J. Virol. 36: 519-525 (1980)
D.T. Simmons, K. Takemoto, M. Martin	Properties of SV40 and BK-Virus T-antigen from productively infected and transformed cells. Virology 85: 137-145 (1978)
R.T. Simpson	Structure and function of chromatin. Adv. Enzym. 38: 41-108 (1968)
A.E. Smith, R. Smith, E. Paucha	Extraction and fingerprint analysis of Simian Virus 40 large and small T-antigen. J. Virol. 28: 140-153 (1978)
A.E. Smith, R. Smith, E. Paucha	Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by Simian Virus 40. Cell 18: 335-346 (1979)
H.S. Smith, C.D. Scher, G.J. Todaro	Induction of cell division in medium lacking serum growth factors by SV40. Virology 44: 359-370 (1971)
E.M. Southern	Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517 (1975)
G. Stein & R. Baserga	The synthesis of acidic nuclear protein in the prereplicative phase of the isoproterenol-stimulated salivary gland. J. Biol. Chem. 245: 6097-6105 (1970)
G. Stein & T.W. Borun	The synthesis of acidic chromosomal proteins during the cell cycle of HeLa S-3 cells. J. Cell Biol. 52: 292-307 (1972)
G. Stein, W. Park, C. Thrall, R. Mans, J. Stein	Regulation of cell cycle stage-specific transcription of histone genes from chromatin by non-histone chromosomal proteins. Nature 257: 764-767 (1975)
F.W. Studier	Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79: 237-248 (1973)
B.H. Sweet & M.R. Hilleman	The vacuolating virus SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 420-513 (1960)

K.B. Tan — Histones: Metabolism in Simian Virus 40-infected cells and incorporation into virus. Proc. Natl. Acad. Sci. US 74: 2805-2809 (1977)

K.B. Tan & F. Sokol — Structural proteins of Simian virus 40 phosphoproteins. J. Virol. 10: 985-994 (1972)

P. Tegtmeyer — Simian Virus 40 deoxyribonucleotide synthesis: The viral replicon. J. Virol. 10: 591-598 (1972)

P. Tegtmeyer — Function of Simian Virus 40 gene A in transforming infection. J. Virol. 15: 613-618 (1975)

P. Tegtmeyer, J.A. Robb, C. Widmer, H.L. Ozer — Altered protein metabolism in infection by the late tsB11 mutant of Simian Virus 40. J. Virol. 14: 997-1007 (1974)

C.S.-Teng & T.H. Hamilton — Role of chromatin in estrogen action in the uterus. II. Hormone-induced synthesis of non-histone acidic proteins which restore histone-inhibited DNA-dependent RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. US 63: 465-472 (1969)

R. Tjian, G. Fey, A. Graessmann — Biological activity of purified Simian Virus 40 T antigen proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. US 75: 1279-1283 (1978)

R. Tjian & A. Robbins — Enzymatic activities associated with purified Simian Virus 40 T antigen-related protein. Proc. Natl. Acad. Sci. US 76: 610-614 (1979)

G. Volkaert, R. Contreras, E. Soeda, A. van de Voorde, W. Fiers — Nucleotide sequence of Simian Virus 40 Hind H restriction fragment. J. Mol. Biol. 110: 467-510 (1977)

G. Walter, R. Roblin, R. Dulbecco — Protein synthesis in Simian Virus 40-infected monkey cells. Proc. Natl. Acad. Sci. US 69: 921-924 (1972)

T.Y. Wang — Restoration of histone inhibited DNA-dependent RNA synthesis by acidic chromatin proteins. Exp. Cell Res. 53: 288-291 (1968)

Y.T. Wang — Activation of transcription in vitro from chromatin by non-histone proteins. Exp. Cell Res. 61: 455-457 (1970)

K. Weber & M. Osborn — The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412 (1969)

R.A. Weinberg — How does T antigen transform cells? Cell 11: 243-246 (1977)

H. Werchau, H. Westphal, G. Maass, R. Haas — Untersuchungen über den Nukleinsäurestoffwechsel von Affennierengewebe-Kulturzellen nach Infektion mit SV40: II. Einfluß der Infektion auf den DNS-Stoffwechsel der Zelle. Arch. Ges. Virusforsch. 19: 351-361 (1966)

F.H. White — Reduction and Reoxidation at disulfid bonds. Meth. Enzymol. 9: 481-484 (1967)

M. White & R. Eason — Nucleoprotein complexes in Simian Virus 40-infected cells. J. Virol. 8: 363-371 (1971)

E. Winocour & E. Robbins — Histone synthesis in Polyoma and SV40-infected cells. Virology 40: 307-315 (1970)

E. Wist, H. Krokan, H. Prydz — Effects of 1-ß-D-arabinofuranosylcytosin triphosphate on DNA-synthesis in isolated HeLa cell nuclei. Biochem. 15: 3647-3652 (1976)

F.C. Wu, S.C.R. Elgin, L.E. Hood — Nonhistone chromosomal proteins of rat tissue: a comparative study by gel electrophoresis. Biochemistry 12: 2792-2797 (1973)

Y.C. Yang, P. Hearing, K. Rundell — Cellular proteins associated with SV40 early gene products in newly infected cells. J. Virol. 32: 147-154 (1979)

K. Zechel — On the resolution of polypeptides by isoelectric focussing in polyacrylamide gels in the presence of urea and Nonidet-P40. Anal. Biochem. 83: 240-251 (1977)

L E B E N S L A U F

Name:	Roswitha Elisabeth Gerhards, geb. Baumann
Anschrift:	Langendreerstr. 60, 4630 Bochum 7
Geburtstag:	17. Februar 1953
Geburtsort:	5090 Leverkusen-Opladen
Eltern:	Wilhelm und Maria Baumann
Schulausbildung:	1959-1963 Besuch der katholischen Volksschule in Opladen 1963-1971 Besuch des neusprachlichen Zweiges der Marienschule in Opladen 1971 Abitur
Studium:	Wintersemester 1971/72 Beginn des Biologiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum
Diplomvorprüfung:	Februar 1974
Diplomhauptprüfung:	Mai 1976 anschließend Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Titel: "Chromosomale Nicht-Histon-Proteine isoliert aus permanenten Zellkulturen von grünen Meerkatzen (Cercopithecus aethiops)" am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Ruhr-Universität Bochum, Leiter Prof. Dr. H. Werchau, die im Juli 1977 abgeschlossen wurde
Promotion:	Beginn der Promotion August 1977 am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Ruhr-Universität Bochum.